



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Estudio de los niveles de
toxinas marinas en moluscos
comerciales a la venta en
grandes superficies

Natalia Miguéns Gómez

Grado en Veterinaria

Año 2019

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Esta obra pertenece a Natalia Miguéns Gómez, y está sujeta a la licencia Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



RESUMO

A presenza de algas mariñas tóxicas está aumentando en todo o mundo e, polo tanto, a acumulación de toxinas mariñas na cadea alimentaria representa unha ameaza para a industria dos moluscos. Galicia é o principal produtor de moluscos bivalvos na Unión Europea (UE) e nas últimas décadas, foi obxecto de numerosos peches de polígonos de mexillóns debido á presenza de biotoxinas, sendo as toxinas lipofílicas as máis habituais nas costas galegas. Neste traballo estudouse a presenza de toxinas lipofílicas en mexillóns comerciais da especie *Mytilus galloprovincialis* procedentes de 3 rías galegas (Ares-Sada, Arousa e Pontevedra) co obxectivo de establecer o risco potencial para o consumidor a través da inxestión dos moluscos. Os mexillóns adquiríronse en grandes superficies e mercados de Lugo e analizáronse mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). A análise levouse a cabo tanto para toxinas lipofílicas reguladas na UE como para as toxinas emerxentes.

Palabras chave: toxinas mariñas, Galicia, mexillóns comerciais, toxinas lipofílicas emerxentes, *Mytilus galloprovincialis*, LC-MS/MS.

RESUMEN

La presencia de algas marinas tóxicas está aumentando en todo el mundo y, por lo tanto, la acumulación de toxinas marinas en la cadena alimentaria representa una amenaza para la industria de los moluscos. Galicia es el principal productor de moluscos bivalvos en la Unión Europea (UE) y en las últimas décadas, ha sido objeto de numerosos cierres de polígonos de mejillones debido a la presencia de biotoxinas, siendo las toxinas lipofílicas las más habituales en las costas gallegas. En este trabajo se ha estudiado la presencia de toxinas lipofílicas en mejillones comerciales de la especie *Mytilus galloprovincialis* procedentes de 3 Rías gallegas (Ares-Sada, Arousa y Pontevedra) con el objeto de establecer el riesgo potencial para el consumidor a través de la ingesta de los moluscos. Los mejillones se compraron en grandes superficies y mercados de Lugo y se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El análisis se llevó a cabo tanto para toxinas lipofílicas reguladas en la UE como para las toxinas emergentes.

Palabras clave: toxinas marinas, Galicia, mejillones comerciales, toxinas lipofílicas emergentes, *Mytilus galloprovincialis*, LC-MS/MS.

ABSTRACT

The occurrence of marine harmful algae is increasing worldwide and therefore, the accumulation of marine toxins in the food chain represents a food safety threat in the shellfish industry. Galicia, which is the main producer of edible bivalve mollusc in the European Union (EU), it was subjected to recurring cases of mussel farm closures in the last decades due to the presence of biotoxins, being the lipophilic marine toxins the most common in our coasts. In this work, the presence of lipophilic marine toxins in commercial mussels *Mytilus galloprovincialis* from 3 Galician Rías (Ares-Sada, Arousa and Pontevedra) were studied. The objective was to establish a potential risk through the ingest. Mussels were purchased in shopping centres and local markets in Lugo and were analysed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The analysis was performed in both regulated lipophilic marine toxins in the EU and emerging toxins.

Key words: marine toxins, Galicia, commercial mussels, emerging lipophilic toxins, *Mytilus galloprovincialis*, LC-MS/MS.

ABREVIATURAS

µg: microgramo

µl: microlitro

ASP: intoxicación amnésica por consumo de moluscos

AZA-1: azaspirácido-1

AZA-2: azaspirácido-2

AZA-3: azaspirácido-3

AZAs: azaspirácidos

CAV: voltaje del acelerador de la celda (cell accelerator voltaje)

CE: energía de colisión

CFP: intoxicación ciguatérica por consumo de pescado

CI: iminas cíclicas

CTX: ciguatoxina

DA: ácido domoico

DSP: intoxicación diarreica por consumo de moluscos

DTX-1: dinofisistoxina-1

DTX-2: dinofisistoxina-2

DTX-3: dinofisistoxina-3

EFSA: Autoridad Europea de la Seguridad Alimentaria

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

eq: equivalentes

g: gramo

GYMs: Gymnodiminas

HABs: floraciones de algas nocivas, del inglés Harmful algal blooms

HomoYTX: homo-yessotoxina

HPLC/UV: cromatografía de líquidos de gran rendimiento con detección ultravioleta

kg: kilogramo

l: litro

LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

M: molar

MBA: Bioensayo en ratón
min: minuto
ml: mililitro
mM: milimolar
MRM: monitoreo de reacciones múltiples
MTXs: maitotoxinas
ng: nanogramo
NSP: intoxicación neurotóxica por consumo de moluscos
OA: ácido okadaico
PbTxS o BTXs: brevetoxinas
PITXs: Palitoxinas
PnTX-G: pinatoxina-G
psi: medida de la presión (Pounds per square inch).
PSP: intoxicación paralítica por consumo de moluscos
PTX-1: pectenotoxina-1
PTX-2: pectenotoxina-2
PTXs: pectenotoxinas
rpm: revoluciones por minuto
SPX-13: espirólido-13
SPXs: espirólidos
STXs: saxitoxinas
TEF: Factor de equivalencia tóxica
TTXs: tetrodotoxinas
UE: Unión Europea
V: voltaje
YTXs: yessotoxinas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. GENERALIDADES.....	9
1.2. FICOTOXINAS MARINAS.....	10
1.2.1. LIPOFÍLICAS.....	11
1.2.1.1. Grupo del ácido okadaico (OA)	11
1.2.1.2. Grupo de las pectenotoxinas (PTXs).....	12
1.2.1.3. Grupo de los azaspirácidos (AZAs)	13
1.2.1.4. Grupo de las Yessotoxinas (YTXs).....	14
1.2.1.5. Grupo de las ciguatoxinas (CTXs)	15
1.2.1.6. Brevetoxinas (PbTx o BTXs).	15
1.2.1.7. Iminas cíclicas (CIs).....	16
1.2.2. HIDROFÍLICAS	17
1.2.2.1. Ácido domoico (DA).....	17
1.2.2.2. Saxitoxinas (STXs)	18
1.2.2.3. Tetrodotoxinas (TTXs).....	19
1.2.3. ANFIFÍLICAS	19
1.2.3.1. Palitoxinas (PITXs)	19
1.2.3.2. Maitotoxinas (MTXs).....	20
2. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	20
3. OBJETIVOS	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1. Material y equipos.....	25
4.2. Reactivos	25
4.3. Obtención y preparación de las muestras	25
4.4. Extracción e hidrólisis.....	26
4.5. Análisis en LC-MS/MS.....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1. Caracterización de las toxinas presentes	29
5.2. Cuantificación de las toxinas.....	31
5.2.1. Rectas de calibrado.....	31
5.2.2. Cálculo de la recuperación de la extracción y del efecto matriz	32
5.2.3. Niveles de toxinas en las muestras	33
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

Las biotoxinas marinas (ficotoxinas) son compuestos naturales producidos por algas microscópicas (fitoplancton), principalmente del grupo de los dinoflagelados y diatomeas pertenecientes a los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis* y *Pseudo-nitzschia* (Farabegoli, Blanco, Rodríguez, Vieites, & Cabado, 2018). Bajo determinadas condiciones de luz, salinidad, nutrientes y, sobre todo, temperatura, estas microalgas pueden reproducirse a un ritmo elevado, con hasta 3-4 divisiones al día, y alcanzar concentraciones de hasta mil millones de células por litro (Botana & Vilariño, 2018). Las floraciones de microalgas son una parte natural del ciclo estacional de los organismos fotosintéticos en los ecosistemas marinos (Berdalet et al., 2015; Visciano et al., 2016). Sin embargo, cuando están implicadas especies de fitoplancton productoras de toxinas, reciben el nombre de floraciones de algas nocivas (HABs, Harmful Algal Blooms), coloquialmente conocidas como las mareas rojas. Asociadas a ellas, generalmente aparece una coloración rojiza en el agua, aunque pueden ser incoloras, pardas, verdes o azules, según el tipo de organismo productor, su profundidad y concentración. A lo largo de los años se han descrito miles de especies de algas, de las cuales, alrededor de 300 tienen efectos perjudiciales y más de 100 producen potentes toxinas naturales que pueden ser nocivas o incluso letales tanto para los animales como para los seres humanos (Berdalet et al., 2015; Farabegoli et al., 2018).

Las biotoxinas marinas se acumulan en los organismos marinos, principalmente en los moluscos bivalvos que se alimentan mediante filtración (O'Mahony, 2018). Estos moluscos se caracterizan por llevar a cabo la filtración de elevadas tasas de agua, aproximadamente 20 L por hora, actuando por lo tanto como concentradores naturales (Davidson et al., 2014; O'Mahony, 2018). De este modo los moluscos pueden acumular grandes concentraciones de toxinas en unos pocos días (Visciano et al., 2016) y llegar a la cadena alimentaria, provocando así las intoxicaciones en el ser humano. El contacto con la piel, agua contaminada con toxinas o la inhalación de aerosoles de estos compuestos también se han descrito como fuentes de intoxicación (Berdalet et al., 2015; Turner et al., 2017). En la Unión Europea (UE), los moluscos bivalvos son la principal fuente implicada en las intoxicaciones por biotoxinas de entre todos los productos pesqueros (O'Mahony, 2018). Además de los efectos directos en la salud humana, las algas tóxicas tienen grandes impactos socioeconómicos (Berdalet et al., 2015) y la industria pesquera se ve seriamente afectada sufriendo las consecuencias derivadas de los cierres cautelares de las zonas de producción (Lin et al., 2015). Estas medidas las toman las autoridades competentes cuando se superan los límites reglamentarios de toxinas, prohibiéndose la recolección de los moluscos para el consumo humano en las áreas afectadas. Durante este período de veda, los moluscos permanecen en el medio marino donde se van depurando mediante el proceso biológico de

filtración. La reapertura de las zonas de producción se permitirá tras obtener dos resultados consecutivos por debajo del límite reglamentario en muestras de moluscos tomadas con más de 48 horas de diferencia por parte de las autoridades competentes (O'Mahony, 2018; Visciano et al., 2016).

Durante los últimos años se ha producido un incremento mundial en la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de las HABs (Botana & Vilariño, 2018; Estévez, Castro, Pequeño-Valtierra, Giraldez, & Gago, 2019; Hattenrath-Lehmann et al., 2018), así como de las biotoxinas presentes en la cadena alimentaria. Existen varias teorías que soportan esta evidencia incluyendo la alteración en la circulación del agua en los puertos, la construcción de playas artificiales, la dispersión de especies a través de aguas de lastre de las embarcaciones y el enriquecimiento de nutrientes en determinadas zonas (Berdalet et al., 2015). También, el incremento de la temperatura del mar como consecuencia del calentamiento global favorece la expansión geográfica de microalgas que antes se limitaban a zonas ecuatoriales y que ahora proliferan en lugares inesperados (Farabegoli et al., 2018; Estevez et al., 2019).

1.2. FICOTOXINAS MARINAS

Las toxinas marinas presentan un mecanismo de acción, una actividad biológica y una estructura molecular muy diversa. Su clasificación ha sido abordada de varias formas: según su mecanismo de acción (Baden & Trainer, 1993), similitud estructural (Wright & Cembella, 1998) o en base a los síntomas observados en humanos tras una intoxicación (Van Dolah, 2000). En este último caso se consideran cinco síndromes causados por varios grupos de toxinas marinas: intoxicación paralizante por consumo de molusco (PSP, paralytic shellfish poisoning), intoxicación diarreica por consumo de molusco (DSP, diarrhetic shellfish poisoning), intoxicación amnésica por consumo de molusco (ASP, amnesic shellfish poisoning), intoxicación neurotóxica por consumo de molusco (NSP, neurotoxic shellfish poisoning) e intoxicación ciguatérica por consumo de pescado (CFP, ciguateric fish poisoning). Dentro de estos grupos, numerosas toxinas difieren en sus estructuras, solubilidad y en su modo de acción. Además, la biotransformación que experimentan algunos compuestos en determinados moluscos da lugar a una amplia gama de metabolitos (Grienke, Silke, & Tasdemir, 2014). Con el descubrimiento de nuevas toxinas emergentes, se ha visto que una mejor forma es clasificar a las toxinas en base a su estructura química. En función del grado de solubilidad en soluciones orgánicas, las toxinas se agrupan en hidrofílicas, anfifílicas y lipofílicas (Hess, 2010) y basándose en su estructura química, las toxinas se pueden clasificar en: grupo del ácido domoico, (DA), grupo del ácido okadaico (OA) incluyendo las dinofisistoxinas (DTXs), azaspirácidos (AZAs), brevetoxinas (BTXs), ciguatoxinas (CTXs), iminas cíclicas (CIs), maitotoxinas (MTXs), palitoxinas (PITXs),

pectenotoxinas (PTXs), grupo de las saxitoxinas (STXs), tetrodotoxinas (TTXs) y yessotoxinas (YTXs). En la presente memoria se utilizarán estas dos últimas clasificaciones.

1.2.1. LIPOFÍLICAS

1.2.1.1. Grupo del ácido okadaico (OA)

Las toxinas más comunes que conforman este grupo son el OA (compuesto de referencia del grupo) y sus análogos la dinofisistoxina-1 (DTX-1), dinofisistoxina-2 (DTX-2) y dinofisistoxina-3 (DTX-3). La DTX-3 se encuentra esterificada con los ácidos grasos. Sin embargo, esta toxina en el tracto digestivo puede hidrolizarse y dar lugar a otros compuestos de este grupo que poseen mayor toxicidad (OA, DTX-1 o DTX-2) (Vilariño et al., 2018). Estas toxinas tienen una distribución mundial y son producidas por dinoflagelados pertenecientes a géneros de *Dinophysis* y *Prorocentrum*, entre los que destacan *D.fortii*, *D.caudata*, *P.lima* y *P.concavum* (Tong, Le, Tu, & Le, 2018). Se acumulan en los moluscos que se alimentan mediante filtración (mejillones, ostras, vieiras, almejas, berberechos) (Vilariño et al., 2018).

La estructura del OA y DTXs se compone de una cadena larga de anillos de poliéter, que contiene un grupo carboxilo ácido y tres anillos espirocetales, uno de los cuales une un anillo de 5 miembros con uno de 6 miembros. Se diferencian únicamente en el número o la posición de los grupos metilo (Farabegoli et al., 2018; Suzuki & Quilliam, 2011).

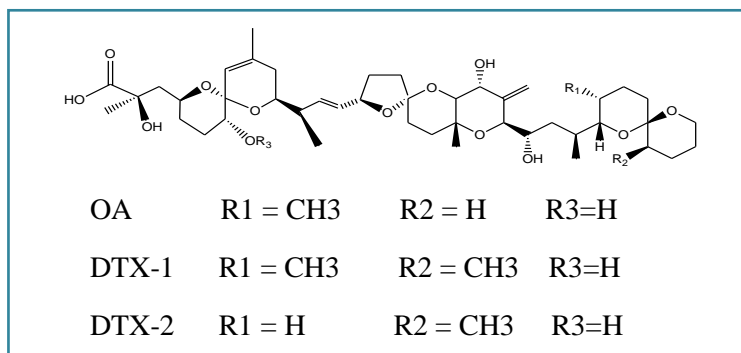


Figura 1. Estructura química de OA y sus análogos.

Las toxinas del grupo del OA actúan inhibiendo las fosfatasa de proteínas (PP2A, PP1 y PP2B principalmente) así como al neuropéptido Y, un inhibidor de la motilidad intestinal y la secreción de electrolitos. Las fosfatasas son moduladoras de la señalización celular, y su inhibición puede causar falta de control de la secreción de sodio y de la permeabilidad celular, provocando inflamación del tracto intestinal (Suzuki & Quilliam, 2011; Vilariño et al., 2018).

La intoxicación por este grupo de toxinas se caracteriza por causar un síndrome diarreico (DSP), que cursa con episodios de diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal en las intoxicaciones

agudas. Se han documentado efectos cancerígenos, afectación del sistema inmune, del sistema nervioso y alteraciones en el ADN y componentes celulares en intoxicaciones crónicas (Nielsen, Hansen, Krock, & Vismann, 2016; Valdiglesias, Prego-Faraldo, Pásaro, Méndez, & Laffon, 2013). Los primeros casos registrados de intoxicación por DSP tuvieron lugar en Japón en los años 1976 y 1977. Posteriormente se reportaron los primeros casos en Europa: España (en el 1978), Francia (década de los 80), Suecia (en 1984) y Portugal (en el 2000) (Tong et al., 2018).

1.2.1.2. Grupo de las pectenotoxinas (PTXs)

Este grupo lo conforman varios análogos siendo la pectenotoxina-2 (PTX-2) el compuesto de referencia debido a su elevada toxicidad y frecuente presencia con respecto al resto de las PTXs (Farabegoli et al., 2018; Visciano et al., 2016). Se han descrito varios homólogos de la PTX-2, como la pectenotoxina-2 seco ácido (PTX-2sa), producto de la transformación metabólica de PTX-2 en los moluscos (Ares et al., 2007; Nielsen et al., 2016). Este grupo de toxinas debe su nombre al organismo donde se descubrieron por primera vez, *Patinopecten yessoensis*. El primer organismo productor de PTXs fue *Dinophysis fortii*, aunque posteriormente se detectaron en otros dinoflagelados como *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. rotundata* y *D. norvegica*.

Este grupo de toxinas posee una estructura distinta a la del OA, compuesta por macrolactonas con múltiples anillos poliéteres termoestables, con estructuras que contienen un grupo espirocetal, tres oxalanos (tetrahidrofuranos), un grupo bicíclico acetal y otro grupo hemiacetal cíclico de seis miembros (Farabegoli et al., 2018).

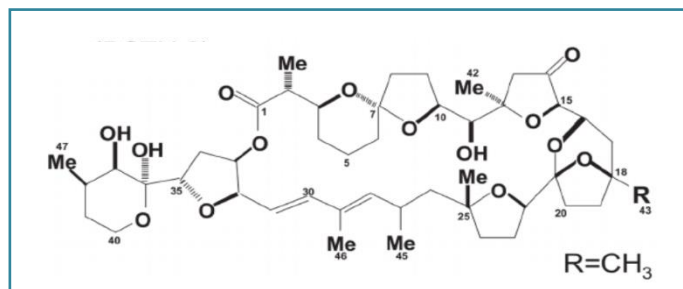


Figura 2. Estructura química de la PTX-2 (Hori et al., 2018).

Las PTXs se solían incluir en el grupo de las DSP, debido a su coexistencia con el OA, pero estudios posteriores demostraron que esta toxina posee mucha menos toxicidad por vía oral, que no causaba diarrea y que además su órgano diana era el hígado, por lo que se excluyeron del grupo del OA (Espiña et al., 2008; Suzuki & Quilliam, 2011).

En cuanto al mecanismo de acción de las PTXs, estudios en animales han demostrado alteraciones en el citoesqueleto de la actina de los hepatocitos (hepatotoxicidad) (Ares et al., 2007) y una potente actividad citotóxica hacia células cancerígenas humanas (Suzuki & Quilliam, 2011). Hasta la fecha no hay evidencias de ninguna intoxicación alimentaria asociada a la exposición a

las PTXs (Farabegoli et al., 2018). Las primeras detecciones de PTX tuvieron lugar en moluscos de Hawai y Japón. Actualmente su distribución es mundial y se han detectado florecimientos de algas productoras de estas toxinas en países europeos como Francia, Grecia, Italia y España (Estevez et al., 2019).

1.2.1.3. Grupo de los azaspirácidos (AZAs)

Este grupo de toxinas lo conforman más de 60 compuestos con diferente grado de toxicidad (Krock, Tillmann, Tebben, Trefault, & Gu, 2019). El elevado número de análogos se debe al proceso de biotransformación de estos compuestos en los moluscos (Vilariño et al., 2018). Las principales especies productoras de estas toxinas son los dinoflagelados *Azadinium* y *Amphidoma* (Pelin et al., 2019; Vilariño et al., 2018) que producen principalmente azaspirácido 1 (AZA-1) que es el compuesto de referencia del grupo, así como azaspirácido-2 (AZA-2) y azaspirácido-3 (AZA-3) que se diferencian en la posición de los grupos metilo. Su estructura consta de una amina cíclica, tres uniones entre anillos de tipo espiro y un grupo ácido carboxílico (Farabegoli et al., 2018).

Se desconoce el modo de acción de los AZAs en los humanos, aunque los ensayos *in vivo* en ratones e *in vitro* en humanos demuestran una absorción intestinal de estos compuestos. Así mismo, se ha visto que poseen una amplia distribución tras su absorción, detectándose en órganos como bazo, riñón, pulmón, corazón, hígado y cerebro (Vilariño et al., 2018).

Las intoxicaciones por AZAs cursan con síntomas gastrointestinales: náuseas, vómitos, diarrea y calambres estomacales, principalmente (Pelin et al., 2019; Visciano et al., 2016). El primer caso documentado de intoxicación por AZAs fue en los Países Bajos en 1995 en mejillones de la especie *Mytilus edulis* (*M.edulis*). Después de esta fecha, se registraron intoxicaciones en Irlanda (1997), Francia (1998), Inglaterra (2000), Dinamarca (2002) y en los Estados Unidos de América (2008) (Ferreiro et al., 2017; Pelin et al., 2019). Hoy en día se han documentado intoxicaciones por AZAs en países de todo el mundo, entre los cuales se encuentra España y Portugal (Blanco et al., 2017).

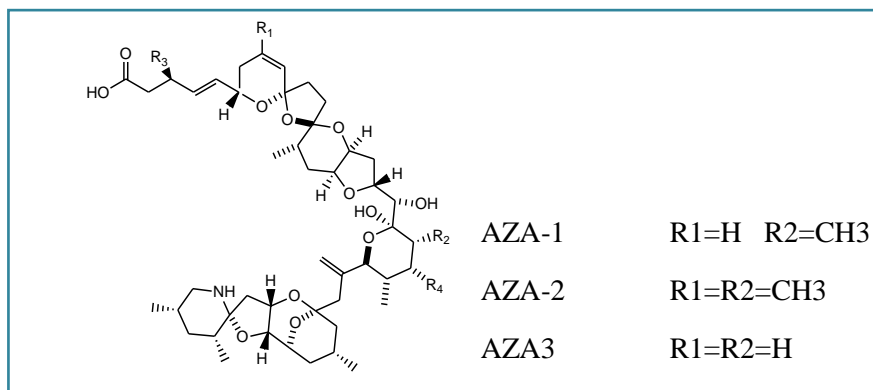


Figura 3. Estructura química de AZA-1, AZA-2 y AZA-3.

1.2.1.4. Grupo de las Yessotoxinas (YTXs)

Las YTXs son éteres policíclicos disulfatados producidos por los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera* (Pitcher et al., 2019). El primer análogo identificado fue el 45-hidroxi-YTX, detectado en la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* y a la que deben su nombre (Murata, Kumagai, Lee, & Yasumoto, 1987). Posteriormente las YTXs también se han detectado en mejillones de las especies *M. edulis* (Noruega), *M. galloprovincialis* (Galicia y Mar Adriático), *Perna canaliculus* (Nueva Zelanda) y *Mytilus chilensis* (Chile) (Paz et al., 2008). A pesar de que la estructura de la mayoría de los compuestos de este grupo no se ha esclarecido, se han descrito más de 100 análogos siendo la homoyessotoxina (homoYTX) y la 45-hidroxi-homoyessotoxina (45-OH-homo-YTX) los más comunes además de la YTX (Farabegoli et al., 2018).

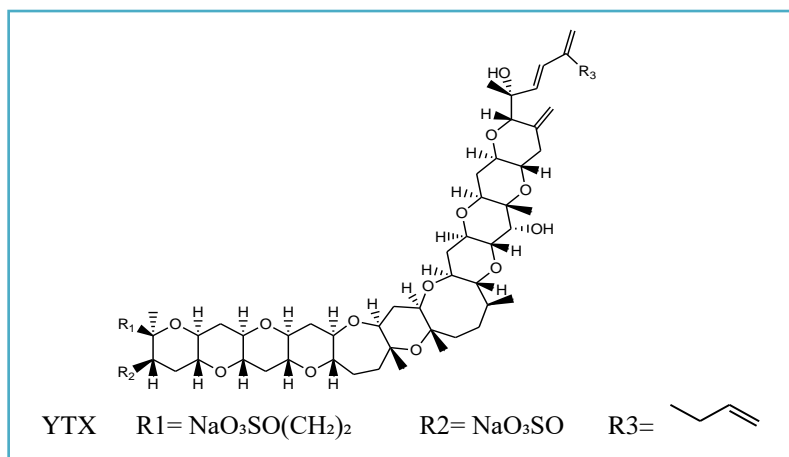


Figura 4. Estructura química de la YTX.

Estas toxinas coexisten a menudo con las del grupo del OA, por lo que en un principio se incluyeron en el grupo de las DSP. Estudios posteriores demostraron una actividad biológica diferente y que además no provocaban episodios diarreicos, por lo que la UE decidió clasificarlas como un grupo separado (Alfonso, Vieytes, & Botana, 2016). La contaminación de moluscos con YTXs se ha reportado en todo el mundo, sin embargo, no se han descrito casos de intoxicación ni síntomas en humanos derivados de su consumo (Alfonso et al., 2016; Farabegoli et al., 2018). Estudios realizados en ratas han demostrado una baja absorción intestinal, en parte debido a la presencia de los grupos sulfato de su estructura (Alfonso, de la Rosa, Vieytes, Yasumoto, & Botana, 2003). Tras la administración de la toxina por vía oral, no se han observado signos clínicos y se ha visto que la mayor parte de la toxina se excreta por las heces (Alfonso et al., 2016). Sin embargo, la administración de esta toxina por vía intraperitoneal resulta letal para los ratones, donde el músculo cardíaco parece ser el órgano diana (Tubaro, Dell'Ovo, Sosa, & Florio, 2010). Las YTXs actúan sobre las fosfodiesterasas 4A, con cambios ultraestructurales en las células intracelulares, así como en los niveles de calcio y AMP cíclico, alteración de moléculas

citoesqueléticas y de adhesión, activación de las caspasas (proteasas) y alteración de la permeabilidad de las mitocondrias (Alfonso et al., 2016; Paz et al., 2016; Pitcher et al., 2019).

1.2.1.5. Grupo de las ciguatoxinas (CTXs)

El término CFP (Ciguatera Fish Poisoning) se utilizó por primera vez en el Caribe para describir una intoxicación producida por la ingestión de un caracol marino, *Turbo pica*, denominado “cigua” por los nativos cubanos. Las ciguatoxinas están producidas por dinoflagelados del género *Gambierdiscus spp.* (Boada et al., 2010) que habita en las aguas cálidas de las regiones tropicales de todo el mundo, por lo que las zonas más afectadas por las toxinas son las islas del Caribe (Puerto Rico, Islas Vírgenes) y del Pacífico (Hawai). Sin embargo, en la última década estas toxinas han aparecido en las costas europeas (Boada et al., 2010; Otero et al. 2010a). A este grupo pertenecen más de 29 análogos (Vilariño et al., 2018) que se clasifican según su origen en: ciguatoxinas del Caribe (C-CTX), ciguatoxinas del Pacífico (P-CTX) y ciguatoxinas del Índico (I-CTX). Todas ellas son poliéteres liposolubles cíclicos altamente oxigenados estables al calor, a la luz y a soluciones metanólicas, sin embargo, su toxicidad parece estar afectada por la acidez. Este tipo de intoxicación, se considera un problema de salud a nivel mundial ya que cada año se estiman 50.000 casos de intoxicaciones (Guzmán-Pérez & Park, 2002). Su intoxicación cursa con una sintomatología gastrointestinal y neurológica (Terao, 2002). Las primeras manifestaciones clínicas son las náuseas, seguidas de vómitos y severos dolores de estómago, acompañados de diarrea acuosa, desórdenes neurológicos, mialgia, desórdenes en el sistema nervioso sensitivo como sensaciones de hormigueo en las manos y pies y el sentimiento de calor cuando se cogen objetos fríos o se toman líquidos fríos (alodinia fría) (Kodama, 2002).

1.2.1.6. Brevetoxinas (PbTxS o BTXs).

Las brevetoxinas son poliéteres liposolubles formados por un esqueleto de 10 anillos éter con una lactona en uno de sus extremos. En función de los sistemas de anillos de la zona central del esqueleto se clasifican en brevetoxina A (o de tipo 1) y en brevetoxina B (o de tipo 2). Las PbTxS son causantes de los episodios de mortalidad de peces, aves y mamíferos marinos (Van Dolah, 2000). Los principales síntomas de NSP (Neurotic Shellfish Poisoning) en humanos se caracterizan por náuseas, sensación de hormigueo, pérdida del control motor y dolor muscular severo (síntomas de carácter neurológico, pero de menor gravedad que los producidos por PSP) (Gessner, 2000). La recuperación tiene lugar en 2-3 días sin que hasta el momento se hayan registrado casos mortales. Se acumulan en mejillones, ostras y almejas y son estables al calor y a los ácidos. El dinoflagelado que las produce es *Karenia brevis*, originario de las costas de Florida y el golfo de México (Gravinese et al., 2019). En los últimos años se han descrito nuevas especies de dinoflagelados capaces de sintetizar toxinas similares a las neurotóxicas (*Chatonella marina*, *Chatonella antiqua*, *Fibroxapsa japónica* y *Heterosigma akashiwo* y nuevas especies del género *Gymnodinium*)

ampliándose el área de distribución a Brasil, España, Japón y Nueva Zelanda (Gessner, 2000; Van Dolah, 2000).

1.2.1.7. Iminas cíclicas (CIs)

Las CIs constituyen una familia de toxinas lipofílicas emergentes y en aumento producidas por varias especies de dinoflagelados marinos. Aunque no se han reportado casos de intoxicaciones en seres humanos, este grupo de compuestos presenta elevada neurotoxicidad en ratones tras la administración por vía intraperitoneal. Los principales compuestos pertenecientes a este grupo son los espirólidos (SPXs), las gymnodiminas (GYMs) y las pinnatoxinas (PnTXs) (EFSA CONTAM Panel, 2010). Además, se incluyen otras toxinas como las pteriatoxinas, los prorocentrólidos, las portiminas y las simbioiminas. (Farabegoli et al., 2018). Todas las CIs presentan una estructura caracterizada por poseer un esqueleto macrocíclico (de 12 a 27 átomos de carbono) limitado en sus extremos por una imina cíclica y un anillo espirocéntrico (Molgó et al., 2017).

Los SPXs representan el grupo más amplio de las CIs y el de mayor distribución geográfica. Los dinoflagelados que los producen son *Alexandrium ostenfeldii* y *Alexandrium peruvianum* y los SPXs más tóxicos son el 13-desmetil SPX-C (SPX-13) que es el compuesto de referencia del grupo (García-Altare et al., 2014), el SPX-C y el 20-metil SPX-G (Farabegoli et al., 2018). Estos compuestos se identificaron por primera vez en mejillones (*M. edulis*) y vieiras (*Placopecten magellanicus*) de las costas de Nueva Escocia (Canadá, 1991) (Otero et al., 2010b). Actualmente se están detectando en países europeos como España, Italia, Escocia, Noruega y Dinamarca (Villar, Rodríguez-Velasco, Ben-Gigirey, & Botana, 2006). Las GYMs se detectaron por primera vez en ostras de la especie *Tiostrea chilensis* en Nueva Zelanda a principios de los años 90 (Farabegoli et al., 2018). Estos compuestos los producen los dinoflagelados *Karenia selliformis* y las mismas especies de *Alexandrium* productoras de SPXs (Rambla-Alegre et al., 2018), lo que sugiere la existencia de vías comunes de biosíntesis entre los dinoflagelados *Karenia selliformis* y *Alexandrium peruvianum* (Farabegoli et al., 2018). Hasta la fecha, las GYMs se han detectado en moluscos importados fuera de Europa (Matarozzi et al., 2019) como mejillones (*M. galloprovincialis*), ostras (*T. chilensis*), vieiras (*Pecten novaezelandiae*) y almejas (*Ruditapes decussatus*) (Farabegoli et al., 2018). El compuesto de referencia de este grupo es la GYM-A (García-Altare et al., 2014). El grupo de las PnTXs consta de 7 análogos cuya estructura química es muy similar a la de los SPXs (EFSA CONTAM Panel, 2010) siendo la pinatoxina-G (PnTX-G) el compuesto de referencia (García-Altare et al., 2014). Estas toxinas aparecieron por primera vez en moluscos de la especie *Pinna muricata* en Japón (1995) y la toxina identificada fue la PnTX-A (Hess et al., 2013; Stivala et al., 2015). Actualmente estos compuestos están apareciendo en ostras, mejillones, navajas y almejas y en numerosas zonas como Japón, China, sur de

Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Noruega, Francia y España, por lo que se puede afirmar que están ampliamente distribuidas (Farabegoli et al., 2018). El organismo productor de estas toxinas es el dinoflagelado *Vulcanodinium rugosum* (Otero, Chapela, Atanassova, Vieites & Cabado, 2011).

Las CIs se conocen como toxinas de "acción rápida" porque inducen la muerte rápida en ratones tras la inyección intraperitoneal (Farabegoli et al., 2018). Todas ellas son potentes moléculas neurotóxicas, cuyo mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de los receptores muscarínicos (mAChRs) y nicotínicos (nAChRs) de la acetilcolina tanto a nivel central como periférico y en la unión neuromuscular (Otero et al., 2011). Estos receptores actúan como mediadores rápidos de la neurotransmisión en los sistemas nerviosos central y periférico. Cabe destacar que no todas las CIs presentan la misma potencia tóxica; estudios *in vivo* en ratones mostraron que el SPX-13 tiene 300 veces más actividad que la GYM-A (García-Altares et al., 2014). Así mismo, las PnTXs son un riesgo para la salud humana debido a su potente toxicidad oral, que contrasta con otras CIs, que pierden su potencia si se administran por esta vía (Stivala et al., 2015). La poca información sobre la absorción, distribución o excreción de los SPXs, GYMs o PnTXs en animales o humanos indica que estos compuestos se absorben a nivel intestinal y se distribuyen a diferentes órganos (Farabegoli et al., 2018). Este grupo de toxinas carecen de métodos oficiales de detección en la UE (Rambla-Alegre et al., 2018).

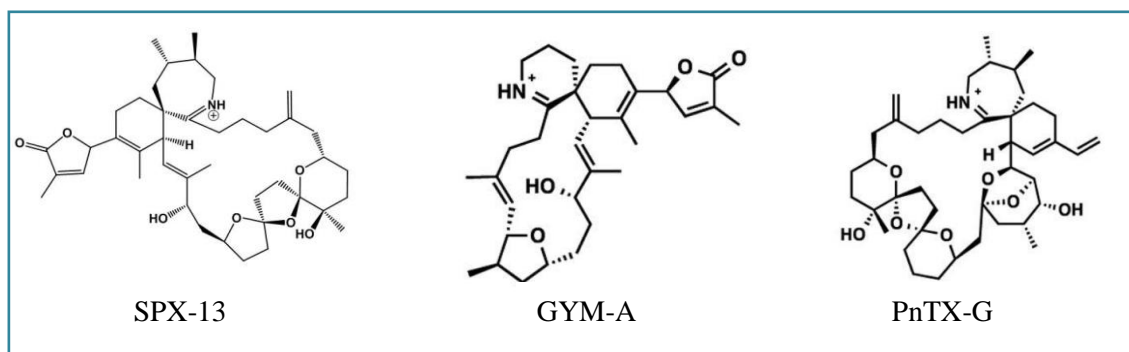


Figura 5. Estructuras del 13-desmetil-SPX-C (SPX-13), la Gymnodimidina A (GYM-A) (Stivala et al., 2015 y de la Pinnatoxina G. (Stivala et al., 2015)

1.2.2. HIDROFÍLICAS

1.2.2.1. Ácido domoico (DA)

El DA es la toxina responsable del síndrome amnésico por el consumo de moluscos (ASP). Esta toxina se aisló por primera vez del alga roja *Chondria armata* (1958) (Farabegoli et al., 2018), posteriormente se identificaron más organismos productores incluyendo diatomeas de los géneros *Nitzschia*, *Pseudo-nitzschia* y *Amphora* (Vilariño et al., 2018). El DA tiene una distribución mundial ya que ha sido detectado en varias especies de moluscos en todo el mundo, incluyendo

Estados Unidos, Nueva Zelanda, México y varios países europeos como Francia, Portugal, Irlanda, España y Croacia (Botana, Otero, Rodríguez, Alfonso, & Botana, 2012). Estas toxinas son compuestos estables al calor, por lo que la cocción del molusco no elimina la toxicidad (Farabegoli et al., 2018). El primer episodio de intoxicación por DA documentado afectó a 150 personas y provocó la muerte de 3 de ellas por haber consumido mejillones (*M. edulis*) contaminados con esta toxina en la Isla Prince Edward (Canadá) en 1987 (Farabegoli et al., 2018; Vilariño et al., 2018). Los síntomas que se observaron fueron de tipo gastrointestinal (náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea), cardiovasculares (arritmias y presión arterial inestable) y neurológicos (desorientación, dolor de cabeza, alucinaciones, convulsiones, problemas de memoria y coma) (Radad, Moldzio, Al-Shraim, Al-Emam, & Rausch, 2018). Estas toxinas también se encuentran en peces como sardinas y anchoas. El DA es una neurotoxina cuyo mecanismo de acción se basa en la sobreestimulación de los receptores de glutamato (AMPA y receptores de cainato) en el sistema nervioso central, causando trastornos neuronales tanto en mamíferos y aves marinas como en los humanos (Hiolski et al., 2016).

1.2.2.2. Saxitoxinas (STXs)

La STX y sus análogos son las responsables de lo que se conoce como intoxicación parálitica (PSP). Se trata de una de las intoxicaciones más estudiadas debido a los graves síntomas que produce en los seres humanos. Los principales organismos productores son dinoflagelados de los géneros (*Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*) y también algunas cianobacterias como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix* y *Microcystis* (Masias, Gómez, Contreras, Gaete, & García, 2019). La STX es la toxina principal, pero se han descrito unos 58 análogos, cuya estructura química se basa en una tetrahidropurina (Farabegoli et al., 2018). En base a ella, se clasifican principalmente en los subgrupos: carbamato, el más tóxico, (STX, neo-STX y GTX 1-4), derivados del N-sulfocarbamoil (GTX-5, GTX-6 y C1-4), derivados del decarbamoil (dc-STX, dc-neoSTX y dc-GTX1-4). (Botana et al., 2012; Vilariño et al., 2018). Son potentes neurotoxinas, cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo del paso del sodio a través de los canales dependientes de voltaje (VGCSs), impidiendo la propagación del potencial de acción en las células neuronales y musculares (Farabegoli et al., 2018). Los síntomas suelen aparecer a los 30 minutos o varias horas tras ingesta de los moluscos contaminados. Los casos más leves cursan con un hormigueo o entumecimiento de la boca y cara. En casos graves se puede manifestar ataxia, incoherencia en el habla, sensación de pinchazos en oídos, rigidez e incoordinación de las extremidades. Todo ello puede acompañarse de debilidad, mialgia y dificultad respiratoria. En intoxicaciones muy graves estas parálisis pueden evolucionar hacia paro respiratorio y provocar la muerte (Vilariño et al., 2018; Farabegoli et al., 2018).

1.2.2.3. Tetrodotoxinas (TTXs)

La neurotoxina TTX y sus 30 análogos son responsables de gran número de intoxicaciones e incluso muertes en humanos, atribuidas al consumo de pez globo (pufferfish) en Japón. Actualmente se ha documentado la presencia de TTX en otros peces y moluscos como almejas, mejillones, berberechos, ostras o vieiras (Leonardo et al., 2019; Vlamis et al., 2015) en países como Australia, Bangladesh, Brasil, Israel, Marruecos, Singapur, Taiwan y USA (Vilariño et al., 2018). Recientemente se han encontrado en productos pesqueros de las costas europeas como España (2007) (Vlamis et al., 2015), Grecia (2006), Reino Unido y Países Bajos (Rodríguez et al., 2008; Vilariño et al., 2018). La TTX se origina a causa de una simbiosis entre bacterias (*Vibrio*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Alteromonas* y *Pseudomonas*) y animales marinos. Determinadas especies de algas como *Alexandrium tamarense* y *Prorocentrum minimum (cordatum)* podrían ser una fuente alternativa de estas toxinas (Farabegoli et al., 2018; Leonardo et al., 2019; Vlamis et al., 2015)

La molécula de TTX tiene una estructura tricíclica y contiene un grupo guanidino cargado positivamente (Estevez et al., 2019). Actúa bloqueando el paso de sodio a través de los canales VGSCs, impidiendo la propagación del potencial de acción en las células musculares y nerviosas (Vlamis et al., 2015). Los síntomas de la intoxicación incluyen parestesia y entumecimiento oral, parálisis motora temprana, incoordinación, dificultad para hablar, afonía y pupilas fijas/dilatadas; insuficiencia respiratoria grave e hipoxia, hipotensión, bradicardia, disritmias cardíacas y pérdida de la consciencia (Vilariño et al., 2018; Bane, Lehane, Dikshit, O'Riordan, & Furey, 2014). En los casos más severos, se acaba produciendo la muerte por insuficiencia respiratoria y colapso cardíaco (Farabegoli et al., 2018).

1.2.3. ANFIFÍLICAS

1.2.3.1. Palitoxinas (PITXs)

Se denomina así debido a la especie de coral Hawaiano de la que fue aislada: *Palythoa toxica*. La palitoxina (PITX) es la toxina no peptídica más potente y grande identificada hasta el momento. Se produce principalmente por anémonas coralinas del género *Palythoa* (*P. tuberculosa*, *P. toxica*, *P. vestitas*, *P. craibdea*, *P. mamillosa*) y por la especie de dinoflagelados *Ostreopsis siamensis* y *Ostreopsis ovata* (Tosteson, 2000). Estructuralmente la PITX es una gran molécula no peptídica formada por una cadena de más de 100 carbonos con 64 centros estereogénicos. Se acumula en numerosos organismos como corales, esponjas, mejillones y crustáceos. Los alimentos contaminados con PITX parecen presentar un sabor amargo y metálico, lo que evita que se ingieran grandes cantidades, aun así, debido a su elevada toxicidad son frecuentes los casos mortales. Casi inmediatamente tras el consumo del alimento, se manifiestan síntomas de toxicidad como diarrea,

vómitos y náuseas, con letargias leves o agudas. Varias horas después de la ingestión los pacientes muestran sensación de quemazón en la zona perioral y en las extremidades, espasmos, temblores, dolor muscular severo, pudiendo llegar al infarto coronario (Tosteson, 2000). En la última década se han registrado crecimientos masivos del dinoflagelado *Ostreopsis ovata* en el mar Mediterráneo, causando una grave preocupación por la producción de PITXs y contaminación de moluscos en las costas europeas (Estevez et al., 2019; Mattarozzi et al., 2019; Visciano et al., 2016).

1.2.3.2. Maitotoxinas (MTXs)

Inicialmente se consideraron CTXs debido a que son producidas por las mismas especies de dinoflagelados del género *Gambierdiscus*. Sin embargo, las diferencias estructurales y farmacológicas hicieron que se clasificaran como un grupo aparte. Su nombre proviene de la denominación del pez cirujano, vector habitual de estas toxinas, en Tahití "maito". Las maitotoxinas son una familia de poliéteres de estructura plana con grupos sulfato e hidroxilo. Los estudios toxicológicos muestran que la maitotoxina afecta a numerosos órganos, ocasionando necrosis celular en el corazón y disminución de la luz vascular, múltiples erosiones y úlceras en estómago e intestino y necrosis masiva de los linfocitos en la corteza del timo (Terao, 2002). A pesar de ser una de las toxinas naturales más potentes conocidas, el hecho de que su toxicidad vía oral sea unas 100 veces inferior y de que sólo se acumule en las vísceras de los peces, favorece que los episodios tóxicos en los que se ha visto implicada no supongan una grave cuestión sanitaria (Lewis, 2002).

2. MÉTODOS DE DETECCIÓN

Las intoxicaciones provocadas por las biotoxinas marinas son un riesgo asociado al consumo de moluscos bivalvos en la UE (Visciano et al., 2016). Cada vez hay nuevos compuestos tóxicos y una mayor expansión de los organismos que los producen. En las últimas décadas se han desarrollado una serie de métodos analíticos *in vivo* como el bioensayo en ratón (MBA), ensayos *in vitro* (celulares, de receptores, de inhibición enzimática e inmunoensayos) y métodos químicos que incluyen análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección por ultravioleta (UV), por fluorescencia (FLD) y por espectrometría de masas (MS). Con el objetivo de prevenir las intoxicaciones, las autoridades competentes han establecido programas de control de las concentraciones biotoxinas tanto en el agua en las zonas de producción como en los moluscos. Cuando se superan los límites establecidos para las toxinas reguladas, se procede al cierre de los polígonos prohibiendo la recolección hasta que los límites vuelvan a estar dentro del rango aceptable. En Galicia, el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño (INTECMAR), es el organismo público de la Xunta encargado de realizar el seguimiento de las

toxinas en las zonas de producción de moluscos y de establecer los cierres cautelares cuando la toxicidad de los moluscos supera el límite regulado.

La aparición de toxinas emergentes preocupa a la UE, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) considera de máxima prioridad la realización de controles y seguimientos periódicos de las concentraciones de biotoxinas en agua y moluscos, principalmente antes de su recolección (Mattarozzi et al., 2019) mediante el uso de métodos analíticos fiables y eficientes (Boada et al., 2010; Estevez et al., 2019). Las regulaciones difieren de unos países a otros. En la UE, el método de referencia para la monitorización de las toxinas lipofílicas es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Reglamento (UE) No 15/2011 de la Comisión, 2011). Este método se desarrolló como alternativa al MBA debido a las consideraciones éticas y de protección de la salud animal que implicaba su utilización. Como período de adaptación a este cambio, se estableció la fecha límite del 31 de diciembre de 2014 para poder seguir empleando el MBA. Por lo tanto, desde el 2015 la tecnología basada en la LC-MS/MS es el método de referencia para la detección de las siguientes toxinas lipofílicas: toxinas del grupo del OA (OA, DTX-1, DTX-2 y DTX-3), toxinas del grupo de las PTXs (PTX-1 y PTX-2), toxinas del grupo de la YTX (YTX, 45-OH-YTX, homoYTX, y 45-OH-homoYTX) y toxinas del grupo de los AZAs (AZA-1, AZA-2 y AZA-3). Actualmente hay un protocolo aprobado por el Laboratorio de Referencia Europeo para biotoxinas marinas (EU-RL-MB, 2015) donde se describen las condiciones del análisis. El método utiliza una cromatografía en fase reversa en una columna de sílica C8 o C18 y un gradiente de elución o isocrático con fases móviles a base de acetonitrilo (ACN) y agua que contienen modificadores volátiles como ácido acético, ácido fórmico, formiato amónico o acetato de amonio.

No hay métodos de detección oficiales para las toxinas anfifílicas (palitoxinas y maitotoxinas) y con respecto a las toxinas hidrofílicas, la legislación europea recoge métodos de detección para el grupo de las PSP (STX, dcSTX, GTX1,4, GTX2,3, GTX5, C1,2, C3,4, NEO) y de las ASP (DA, iso-DA A, D, E, F y epi-DA) (Reglamento (CE) No 853/2004 del parlamento europeo y del consejo, 2004). Debido a un cambio legislativo, desde el 1 de enero del 2019, el método oficial de referencia en la UE para la detección de las PSP es el método Lawrence (Reglamento (UE) No 2017/1980 de la Comisión, 2017). Éste es un método por cromatografía líquida con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y oxidación pre-columna y debe sustituir al anteriormente utilizado MBA. El método de referencia para las toxinas ASP es la cromatografía líquida con detección ultravioleta (HPLC/UV), ELISA o cualquier otro método validado reconocido internacionalmente, prevaleciendo la HPCL/UV en caso de discrepancia en los resultados (Reglamento de ejecución (UE) No 2019/627 de la Comisión, 2019). La tabla 1 recoge las toxinas reguladas en la UE, los métodos oficiales para su detección y los límites para cada uno de los grupos de toxinas. Las toxinas emergentes como las CIs carecen de métodos de detección oficiales

en la UE, aunque se suelen incluir en los métodos de detección multitoxina por LC-MS/MS (Botana et al., 2012) Así, los SPXs se suelen incluir en el monitoreo de las toxinas lipofílicas mediante la LC-MS/MS, para los que además se ha recomendado no superar la cantidad de 400 µg/kg de carne (Yasumoto, 2000). A pesar de que las CTXs tampoco están reguladas en la UE la legislación establece que los productos pesqueros que contengan CTXs y los pescados pertenecientes a las familias *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* y *Canthigasteridae* no deben comercializarse (Reglamento (CE) No 853/2004 del parlamento europeo y del consejo, 2004). Para los moluscos contaminados con TTX la EFSA recomienda no exceder los 44 µg/kg, ya que niveles superiores suponen un riesgo para los consumidores (EFSA CONTAM Panel, 2017).

Tabla 1. Principales toxinas emergentes y reguladas en la UE, los grupos a los que pertenecen, métodos oficiales de detección y los límites establecidos en la UE en los reglamentos 853/2004 y 786/2013.

Grupo	Toxinas principales	Métodos de detección de referencia	Límites en la UE
TOXINAS LIPOFÍLICAS			
OA	OA, DTX-1, DTX-2, DTX-3	LC-MS/MS	160 µg OA eq/kg
PTXs	PTX-1, PTX-2	LC-MS/MS	
AZAs	AZA-1, AZA-2, AZA-3	LC-MS/MS	160 µg AZA-1 eq/kg
YTXs	YTX, 45-OH-YTX, homoYTX, 45-homoYTX	LC-MS/MS	3,75 mg YTX eq/kg
CI s	SPXs y PnTXs	-	No reguladas
TOXINAS HIDROFÍLICAS			
DA	DA, iso-DA A, D, E, F y epi-DA	HPLC/UV o ELISA	20 µg DA/kg
STXs	STX y análogos. (Grupo carbamato, decarbamoil, N-sulfocarbamoil)	Lawrence	800 µg STX-eq 2-HCl/kg

En general, las toxinas hidrofílicas y anfifílicas son las más peligrosas porque dan lugar a síntomas neurotóxicos que pueden producir la muerte. Las toxinas lipofílicas son menos peligrosas, sin embargo, son las más frecuentes en las costas gallegas. Por este motivo en el presente trabajo se enfocó en el análisis de toxinas lipofílicas en los moluscos gallegos. Su detección se llevó a cabo mediante LC-MS/MS. La cromatografía líquida (LC) es una técnica de separación analítica basada en la distinta movilidad de las moléculas presentes en una muestra a través de una fase móvil (un líquido). La muestra junto con la fase móvil pasa a través de una columna cromatográfica (fase estacionaria), en la que las moléculas quedan retenidas o se desplazan con la fase móvil. De esta forma los componentes de la muestra se separan originando una señal gráfica (cromatograma) característica de cada molécula. Los cromatogramas permiten realizar análisis cualitativos y/o cuantitativos, en función de la posición de los picos, tiempo de retención

y su área. La detección por espectrometría de masas (MS) se basa en el distinto comportamiento de los iones formados debido a la ionización (Wunschel, Valenzuela, Kaiser, Victry, & Woodruff, 2018). En general la LC-MS/MS es un método específico y permite la detección simultánea de varias toxinas con un límite de detección (LOD) y un límite de cuantificación (LOQ) bajos.

3. OBJETIVOS

Las toxinas marinas constituyen un grave problema económico y sanitario para la industria productora, envasadora y comercializadora de moluscos. Galicia es el principal exportador de estos productos y, por tanto, es particularmente sensible a la aparición de estos episodios tóxicos que cada año se suceden desde que se controla su presencia. Los episodios de toxinas lipofílicas son cada vez más frecuentes en las costas gallegas. Los sistemas oficiales de monitorización y control garantizan la seguridad de los moluscos destinados al consumo. Sin embargo, la aparición de nuevas toxinas emergentes cada vez más recurrentes junto con una alta demanda de mejillones gallegos hace que se requieran investigaciones adicionales sobre el riesgo potencial de las ficotoxinas para el consumidor. En este contexto, los objetivos del presente trabajo son:

1. Investigar el perfil de toxinas lipofílicas de mejillones comerciales de la especie *Mytilus galloprovincialis* de origen gallego adquiridos en varios mercados y evaluar el riesgo potencial para el consumidor derivado de la ingesta de toxinas emergentes.
2. Establecer el impacto del margen de error analítico al comercializar productos que tienen toxinas por debajo del límite legal pero que están muy cerca del valor máximo permitido.

4. METODOLOGÍA

4.1. Material y equipos

Para la realización del presente trabajo se ha utilizado el siguiente material de laboratorio: cuchillos, tijeras, homogeneizador de alta velocidad (T25 digital Ultra-Turrax™, IKA), balanzas de precisión, espátulas, agitadores vórtex, centrífugas, micropipetas, evaporadores centrífugos, baño de agua con regulador de temperatura, filtros de tamaño de poro 0,22 µm, viales de LC-MS/MS e insertos. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (1290 Infinity) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent G6460C Triple Quadrupolo) equipado con una fuente ESI Agilent Jet Stream (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y una columna AQUITY UPLC BEH C18 (2,1 × 100 MM, 1,7 µm, Waters).

4.2. Reactivos

En la realización de la presente memoria se han utilizado los siguientes reactivos químicos: acetonitrilo, metanol, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico que se obtuvieron de PanReac (Barcelona, España), el ácido fórmico (98-100%) se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania) y el formiato de amonio ($\geq 99\%$) de Sigma-Aldrich (Madrid). Todos los disolventes eran de calidad analítica o HPLC y el agua se obtuvo de un sistema de purificación de agua (Milli-Q, Millipore, España). Los estándares de referencia certificados de las toxinas fueron proporcionados por Cifga (Lugo): sal sódica de DTX-1 ($8,08 \pm 0,41 \mu\text{g/g}$), sal sódica de DTX-2 ($2,54 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$), sal sódica de OA ($20,2 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$), YTX ($7,42 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$), homo-YTX ($7,68 \pm 0,44 \mu\text{g/g}$), AZA1 ($1,36 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$), AZA2 ($1,33 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$) y AZA3 ($1,30 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$). Las soluciones de calibración certificadas de PnTX-G ($2,43 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$) y de PTX-2 ($5,58 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$) fueron adquiridas del Instituto National Research Council, Canadá (Ottawa, Ontario).

4.3. Obtención y preparación de las muestras

Se trabajó con un total de 41 mallas de 1 kg de mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis*. Éstas se adquirieron semanalmente en cinco mercados locales y centros comerciales de Lugo durante los meses de diciembre de 2018 y enero de 2019. El número de muestras y la fecha de la compra se describen en la tabla 2. Los mejillones eran de cinco marcas comerciales (denominadas A, B, C, D y E) y pertenecían a tres rías gallegas (Ares-Sada, Arousa y Pontevedra). Se adquirieron frescos y vivos, se mantuvieron en bolsas de polietileno y se transportaron inmediatamente al laboratorio donde se comenzó con la preparación de las muestras. Veintidós muestras procedían de mejillones pequeños, con unas 30-35 piezas por malla y 19 muestras eran de mayor tamaño, con unos 24-27 individuos por malla. Para empezar, se extrajo la carne de los mejillones separando los músculos aductores y los tejidos adheridos a las valvas. Luego, la carne

se homogeneizó en el Ultra Turrax™ y se obtuvo un homogeneizado de textura viscosa, que se guardó en bolsas con cierre zip. Estas muestras se almacenaron en congeladores a una temperatura de -20°C, protegidas de oxígeno y luz hasta su posterior análisis. Cada muestra provenía de una cantidad de 100g-200g de homogenizado de mejillones.

Tabla 2. En la tabla se detallan las semanas en las que los mejillones fueron comprados, el comercio donde se adquirieron (A, B, C, D, E), el tamaño de mejillón (grande: G; pequeños: P) de cada malla y la ría de procedencia (AS: Ares-Sada; A: Arousa y P: Pontevedra).

	SEMANA 1 (Diciembre 2018)						SEMANA 2 (Diciembre 2018)						
Nº de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Comercio	A	C	D	D	E	E	A	B	C	D	E	B	C
Tamaño	G	P	P	G	G	P	G	P	P	G	G	G	P
Ría de procedencia	AS	A	A	A	P	P	AS	A	A	P	P	A	A

	SEMANA 3 (Enero 2019)					SEMANA 4 (Enero 2019)				
Nº de muestra	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Comercio	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Tamaño	G	P	G	G	P	G	P	P	G	P
Ría de procedencia	AS	A	A	A	P	AS	A	A	A	P

	SEMANA 5 (Enero 2019)					SEMANA 6 (Enero 2019)						
Nº de muestra	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Comercio	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	B	C
Tamaño	G	P	G	G	P	G	P	G	G	P	G	P
Ría de procedencia	AS	A	A	A	P	AS	A	A	A	P	A	A

	SEMANA 7 (Enero 2019)					
Nº de muestra	36	37	38	39	40	41
Comercio	A	B	C	D	E	B
Tamaño	G	P	P	G	P	G
Ría de procedencia	AS	A	A	A	P	A

4.4. Extracción e hidrólisis

Las muestras se analizaron siguiendo el protocolo descrito en el Procedimiento Operativo Estándar Armonizado de la UE (SOP) para la determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos mediante LC-MS/MS (EU-RL-MB, 2015). Se pesó una cantidad de $2,00 \pm 0,05$ g de homogeneizado de mejillón y se transfirió a un tubo. Luego, se agregaron 9 ml de metanol y la muestra fue homogeneizada en un agitador vórtex durante 3 minutos a máxima velocidad. Después, las muestras se centrifugaron a 3700 rpm durante 10 min a 20 °C y el sobrenadante se

transfirió a un frasco volumétrico de 20 ml. Se llevó a cabo una segunda extracción de la carne de mejillón con otros 9 ml de metanol, utilizando esta vez un homogeneizador de alta velocidad (T25 digital Ultra-Turrax™, IKA) y posteriormente, se centrifugó a 3700 rpm durante 10 min a 20 °C. A continuación, se combinaron los sobrenadantes y se llevaron hasta un volumen final de 20 ml con metanol. Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los análisis, una alícuota de 15 ml de este extracto se concentró a 5 ml. Se filtraron 500 µl a través de filtro de 0,22 µm utilizando para ello una centrífuga (13000 rpm × 5 min a 20°C). Por último, se pasaron los 500 µl filtrados a los viales de LC-MS/MS y se procedió a su análisis.

Como la DTX-3 se encuentra esterificada con los ácidos grasos, para detectar y cuantificar el contenido total de OA y DTXs, se realizó una hidrólisis alcalina. Para ello 2,5 ml del extracto metanólico resultante de la extracción se pusieron en contacto con 313 µl de NaOH 2,5 M. La mezcla se homogeneizó y se calentó a 76 °C durante 40 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizó con 313 µL de HCl 2,5 M y se homogeneizó en el vórtex. El extracto resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y luego se analizó por LC-MS/MS.

4.5. Análisis en LC-MS/MS

Los análisis se realizaron en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (1290 Infinity) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent G6460C Triple Quadrupolo) equipado con una fuente ESI Agilent Jet Stream (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Las toxinas se separaron mediante una columna AQUITY UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm, 1,7 µm) a 40 °C. La fase móvil A era agua y la B contenía acetonitrilo-agua (95:5), ambas con 50 mM de ácido fórmico y 2 mM de formiato de amonio. La separación se realizó mediante un gradiente y un flujo de 0,4 mL/min. Inicialmente, se comenzó con un 30% B, luego se continuó con un gradiente lineal hasta un 70% B en 3 min. Después se mantuvo un gradiente isocrático lineal de 1,5 min al 70% B y se volvió a las condiciones iniciales del 30% B en 0,1 min. Finalmente, el 30% B se mantuvo durante 1,99 min antes de la siguiente inyección. Los viales de muestras se mantuvieron a 4 °C y el volumen de inyección fue de 5 µL. El análisis se realizó utilizando dos métodos en modo de adquisición de monitorización de reacción múltiple (MRM) usando dos transiciones por toxina. La transición que presenta la intensidad más alta se usa para la cuantificación de la toxina, mientras que la transición con baja intensidad se usa para confirmar el compuesto. En el método de masas se incluyeron las transiciones de las toxinas reguladas en la UE y las emergentes pertenecientes a los grupos SPXs y PnTXs (Tabla 3). Con la excepción del grupo del OA y de la YTX que se ionizan en modo negativo, el resto de las toxinas lipofílicas se ionizan en modo positivo.

Tabla 3. Parámetros del método LC-MS/MS para las toxinas marinas reguladas y para las toxinas de los grupos de SPXs y PnTXs. Se muestran los iones precursor y producto monitorizados (m/z), el voltaje del fragmentador (Frag), la energía de colisión (CE) y el voltaje del acelerador de celda (CAV) en voltios (V).

Toxinas	Ión precursor (m)	Ión producto (z)	Frag	CE	CAV	Polaridad
45-OH-homo-YTX	1171,5	$\frac{1091,5}{869,5}$	250	$\frac{40}{88}$	4	Negativa
45-OH-YTX	1157,5	$\frac{1077,5}{871,5}$	240	$\frac{38}{86}$	4	Negativa
Homo-YTX	1155,48	$\frac{1075,5}{869,4}$	250	$\frac{40}{88}$	4	Negativa
YTX	1141,47	$\frac{1061,5}{855,4}$	240	$\frac{38}{86}$	4	Negativa
PTX-1	892,5	$\frac{821,5}{213,2}$	175	$\frac{28}{44}$	2	Positiva
PTX-2	876,5	$\frac{823,5}{213,2}$	175	$\frac{28}{44}$	2	Positiva
AZA-1	842,5	$\frac{824,5}{806,5}$	206	$\frac{32}{44}$	2	Positiva
AZA-2	856,5	$\frac{838,5}{820,5}$	213	$\frac{36}{44}$	4	Positiva
AZA-3	828,5	$\frac{810,5}{792,5}$	216	$\frac{32}{44}$	2	Positiva
OA/DTX-2	803,46	$\frac{113,2}{255,1}$	350	$\frac{66}{50}$	7	Negativa
DTX-1	817,5	$\frac{255,1}{113}$	350	$\frac{54}{70}$	7	Negativa
SPX-13	692,45	$\frac{674,4}{164,1}$	180	$\frac{42}{54}$	4	Positiva
SPX-13,19	678,44	$\frac{660,4}{164,1}$	149	$\frac{30}{54}$	4	Positiva
SPX-20G	706,47	$\frac{688,4}{164,1}$	152	$\frac{30}{54}$	4	Positiva
Pinatoxina G	694,47	$\frac{440,1}{164,1}$	149	$\frac{30}{54}$	4	Positiva
Pinatoxina E	784,5	$\frac{446,3}{164,1}$	149	$\frac{30}{54}$	4	Positiva
Pinatoxina D	782,48	$\frac{446,3}{164,1}$	149	$\frac{30}{54}$	4	Positiva
Pinatoxina F	766,5	$\frac{446,3}{164,1}$	149	$\frac{30}{54}$	4	Positiva
Pinatoxina B e C	741,47	$\frac{458,3}{164,1}$	149	$\frac{30}{54}$	4	Positiva
Pinatoxina A	712,44	$\frac{458,3}{164,1}$	149	$\frac{30}{54}$	4	Positiva

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de las toxinas presentes

Se disponía de 41 muestras de mejillón adquiridas en Lugo y procedentes de 3 Rías gallegas (Ares-Sada, Arousa and Pontevedra). Con el objetivo de caracterizar los perfiles de toxinas lipofílicas de estos moluscos, lo primero que se hizo fue un análisis completo de toxinas lipofílicas tanto las reguladas en UE (grupo del OA, PTXs, YTXs y AZAs) como de las toxinas emergentes, incluyendo SPXs (SPX-13, SPX 13,19 and SPX-20) y PnTXs (PnTX-A, B, C, D, E, F and G). Para ello, después de llevar a cabo la extracción (descrita en la sección metodología) cada una de las muestras se analizó por LC-MS/MS. La identificación de cada compuesto se realizó comparando el tiempo de retención de los cromatogramas identificados en las muestras con el del estándar de las toxinas, utilizando las transiciones específicas (iones m/z , detallados en la tabla 3) y mediante la relación entre las transiciones de los compuestos de las muestras y las del estándar. Tras estudiar los cromatogramas para cada una de las muestras, en primer lugar, se pudo confirmar la presencia de OA, DTX-2, PTX-2, AZA-2 y SPX-13 en la mayoría de las muestras (Figura 8). Este es el perfil típico de toxinas para las costas gallegas, con OA y DTX-2 debido a *Dynophysis acuta* y *Dynophysis acuminata* (Rodríguez, I., Alfonso, Antelo, Alvarez, & Botana, 2016), PTX-2 debido a *D. acuta* y *Dynophysis caudata* (Luisa Fernández, Reguera, González-Gil, & Míguez, 2006) y AZA-2, probablemente producida por *Azadinium spp* (Blanco et al., 2017). La presencia de SPX-13 también es frecuente en Galicia y otras regiones europeas debido a la presencia de *Alexandrium ostenfeldii* o *Alexandrium peruvianum* y, por este motivo, esta toxina a menudo se incluye en los programas de monitoreo junto con el resto de las toxinas legisladas. Además, los análisis mostraron la presencia de la toxina emergente PnTX-G (RT = 3.1 min) en 5 muestras (figura 9). Como ya se ha descrito anteriormente, esta toxina la produce el dinoflagelado *Vulcanodinium rugosum* y en los últimos años ha aparecido en moluscos procedentes de costas de países europeos como Noruega (Rundberget, Aasen, Selwood, & Miles, 2011), Francia (Hess et al., 2013), Italia, Eslovenia y también en la costa catalana de España (García-Altares et al., 2014; Rambla-Alegre et al., 2018). Sin embargo, no se había descrito en Galicia. Esta es la primera vez que se confirma la PnTX-G en mejillones comerciales de la costa atlántica gallega.

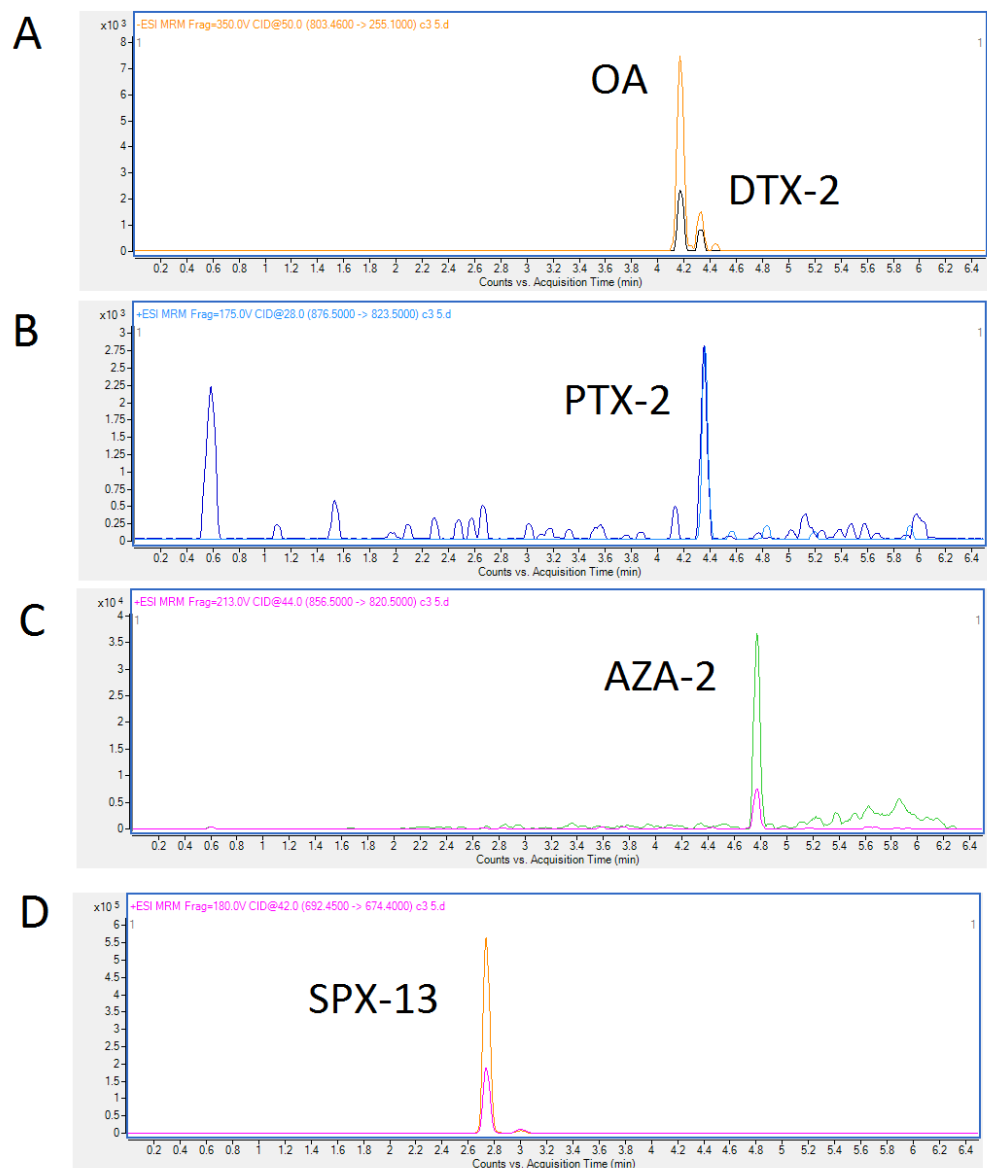


Figura 8. Cromatogramas del ácido okadaico (OA) y dinofisistoxina-2 (DTX-2) (A), pectenotoxina-2 (PTX-2) (B), azaspirácido-2 (AZA-2) (C) y espirólido 13-desmetil C (SPX-13) (D) detectados en mejillones comerciales. Los cromatogramas corresponden a las toxinas encontradas en la muestra nº 5.

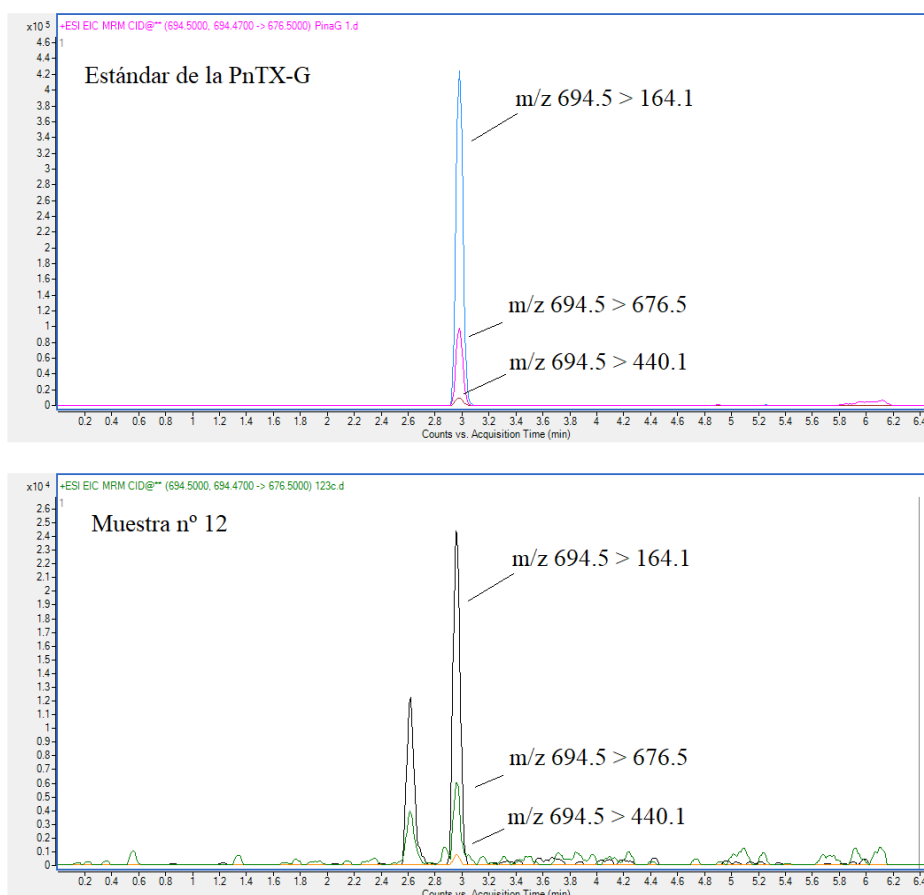


Figura 9. Cromatogramas del estándar de PnTX-G y de esta toxina encontrada en las muestras. Se incluyen las 3 transiciones más representativas de este compuesto y se aprecia el mismo tiempo de retención para el estándar de PnTX-G y para este compuesto en la muestra. La muestra del cromatograma es la n° 12.

5.2. Cuantificación de las toxinas

Después de la caracterización, el siguiente paso fue cuantificar las toxinas identificadas en las muestras. La cuantificación de cada toxina se realizó por medio de una calibración externa y teniendo en cuenta la recuperación del proceso de extracción y el efecto de la matriz que puede influir en el análisis por LC-MS/MS.

5.2.1. Rectas de calibrado

Para la elaboración de las rectas de calibrado se utilizaron los estándares de toxinas descritos en el apartado de reactivos, a partir de los cuales se prepararon diez niveles comprendidos entre 0,09 ng/ml y 50 ng/ml (0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50 ng/ml) y usando metanol como disolvente. La validez de las curvas de calibrado y del método de detección se valoró por la linealidad registrando el coeficiente de regresión lineal de las curvas de calibrado (R^2) y sus pendientes. Para considerarlas aceptables el R^2 debía ser $\geq 0,98$ y la variación entre las pendientes

de las curvas no debía superar el 25%. La tabla 4 incluye un ejemplo de las rectas de calibrado utilizadas para cuantificar cada una de las toxinas presentes en las muestras y los R².

5.2.2. Cálculo de la recuperación de la extracción y del efecto matriz

Con el objetivo de evaluar los efectos del procedimiento de extracción y de la matriz, se utilizó homogeneizado de mejillón para calcular la recuperación de las toxinas y la corrección del efecto matriz. Para ello, se empleó como blanco el homogeneizado de mejillón que resultó no tener toxina tras el análisis por LC-MS/MS. Posteriormente se contaminó con una alícuota de cada toxina, se realizó el proceso de extracción y por último se analizó el contenido de toxina por LC-MS/MS. La recuperación (% R) del proceso de extracción se calculó de la siguiente manera: $R = \left(\frac{(\text{ng/ml}) \text{ calculado (cantidad de toxina obtenida después de la extracción)}}{(\text{ng/ml}) \text{ teórico (cantidad de toxina con la que se contaminó el homogeneizado de mejillón)}} \right) \times 100$.

Para determinar la supresión o aumento de la señal (SSE) debida a la matriz, se utilizó nuevamente el blanco de homogeneizado de mejillón al que se le realizó el proceso de extracción descrito anteriormente. El extracto resultante libre de toxinas pero con la matriz de mejillón (extracto utilizado como blanco) se utilizó para construir las rectas de calibrado de cada toxina. Posteriormente, se prepararon otras rectas de calibrado de cada uno de los estándares en metanol y se analizaron ambas rectas por LC-MS/MS. Se registraron las pendientes de ambas curvas para determinar el efecto matriz de acuerdo con la siguiente ecuación: $\% SSE = \left(\frac{\text{pendiente de la recta construida en el extracto de mejillón}}{\text{pendiente de la curva construida en metanol}} \right) \times 100$.

Si el valor de SSE es igual a 100% significa que no se observa ningún efecto de la matriz, mientras que si el valor es superior a 100% quiere decir que hay un efecto de matriz positivo debido a un aumento de la señal en el pico cromatográfico. Si este valor es inferior al 100% significa que hay un efecto matriz negativo, lo que implica una supresión de la señal. Los resultados finales de las concentraciones de toxinas detectadas se corrigieron teniendo en cuenta la recuperación y los efectos de la matriz de la siguiente forma: $\mu\text{g toxina/kg} = (\mu\text{g/kg}) \text{ calibración externa} \times (100 / \%R) \times (100 / \%SSE)$, donde la calibración externa es la recta preparada en metanol.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. Las recuperaciones fueron elevadas para la PTX-2 (92%), AZA-2 (98%), SPX-13 (110%) y para la PnTX-G (90%). También se obtuvieron valores altos para el OA (76%) y DTX-2 (85%) extraídas en su forma libre en comparación con las recuperaciones obtenidas cuando se usó el proceso de hidrólisis. En este último caso, se obtuvo una recuperación del 63% para el OA y del 62% para el DTX-2. Los resultados de la evaluación de la matriz mostraron una supresión de la señal para la PTX-2, AZA-2, SPX-13 y PnTX-G, ya que los valores eran inferiores al 100% (tabla 4), lo que implicaría una cuantificación menor a la real si cuantificáramos con una curva en metanol y no aplicáramos este factor. Por otro lado, se observó un aumento de la señal para el OA y la DTX-2 con valores de 211,70% y 181,51% para

OA y DTX-2 extraídos en sus formas libres y valores de 162,37 % y 160,25 % para estas toxinas en su forma de ésteres.

Tabla 4. Curvas de calibración en metanol, coeficientes de regresión (R^2), recuperación de la extracción (R) y supresión o amplificación de señal (SSE) debido a la matriz. Los valores mostrados son la desviación media \pm estándar (SD) de tres experimentos.

Toxina	Curvas	R^2	R (%)	SSE (%)
OA libre	$y = 2381,975x - 561,583$	0,9977	$76,03 \pm 15,28$	$211,70 \pm 19,54$
DTX-2 libre	$y = 2013,034x + 633,298$	0,9937	$85,24 \pm 4,29$	$181,51 \pm 6,85$
PTX-2	$y = 34362,389x - 5660,310$	0,9987	$92,34 \pm 4,88$	$88,27 \pm 6,37$
AZA-2	$y = 543036,015x + 83486,877$	0,9962	$98,8 \pm 4,80$	$33,14 \pm 1,65$
SPX-13	$y = 581714,049x + 292701,316$	0,9997	$110,48 \pm 0,86$	$70,27 \pm 6,75$
PnTX-G	$y = 387054,739x + 39641,076$	0,9994	$90,95 \pm 1,61$	$64,74 \pm 3,58$
OA hidrolizado	$y = 1956,583x - 217,441$	0,9992	$63,28 \pm 1,61$	$162,37 \pm 14,85$
DTX-2 hidrolizada	$y = 1702,876x + 585,842$	0,9991	$62,63 \pm 1,63$	$160,25 \pm 3,81$

5.2.3. Niveles de toxinas en las muestras

Una vez determinado el porcentaje de recuperación del proceso de extracción y el efecto de la matriz en el método analítico, se determinaron los niveles de cada una de las toxinas en las muestras teniendo en cuenta estos dos parámetros. Además, para expresar los resultados por grupo de toxinas de acuerdo con la legislación europea, como μg compuesto de referencia equivalentes/kg, se requiere el uso de los Factores Equivalentes de Toxicidad (TEF) adoptados por el Panel Científico sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria de EFSA (EFSA CONTAM Panel, 2009). Su cálculo se basa en la toxicidad aguda registrada tras la administración intraperitoneal en ratones (Otero & Alfonso, 2015). De esta forma se permite cuantificar la toxicidad combinada de los diferentes análogos. Por lo tanto, después de calcular el contenido individual de cada toxina, se multiplicó por el TEF antes de sumar los equivalentes totales para cada grupo de toxina. La tabla 5 recoge los valores TEF utilizados en el presente trabajo.

Tabla 5. Valores de los TEFs establecidos por el “CONTAM Panel” para las toxinas lipofílicas legisladas en la UE (EFSA CONTAM Panel, 2009)

	OA	PTXs	AZAs	YTXs
TEFs	OA= 1 DTX-1=1 DTX-2=0,6	PTX-1=1 PTX-2=1	AZA-1=1 AZA-2=1,8 AZA-3=1,4	YTX=1 hYTX=1 45-OH-YTX=1 45-OH-homoYTX=0,5

La tabla 6 incluye la cuantificación de cada toxina individualmente y la cantidad de toxina de cada grupo expresada como $\mu\text{g eq/kg}$, de acuerdo a los valores TEF. Se encontraron toxinas lipofílicas en 38 de las 41 muestras analizadas, hallándose OA en todas las que resultaron positivas a toxinas. Los niveles más altos fueron para OA que oscilaron entre $3,6 \mu\text{g/kg}$ (muestra nº 25) y $214 \mu\text{g/kg}$ (muestra nº 22) y se detectaron en 38 muestras, seguido por DTX-2 detectado en 21 muestras en cantidades de hasta $33,5 \mu\text{g/kg}$ (muestra nº 22) y seguido por SPX-13 detectado en 18 muestras hasta $28,9 \mu\text{g/kg}$ (muestra nº 18). El análisis de PTX-2, AZA-2 y PnTX-G mostró cantidades más pequeñas. Quince muestras fueron positivas para PTX-2 con niveles que oscilaron entre $0,7$ (muestra nº 17) y $2,9 \mu\text{g/kg}$ (muestra No. 21), AZA-2 se observó en 12 muestras ($0,1$ - $1,8 \mu\text{g/kg}$) y PnTX G en 5 muestras en cantidades muy bajas ($0,4 \mu\text{g/kg}$ - $0,9 \mu\text{g/kg}$). En general, las cantidades estaban por debajo del límite regulado para cada grupo de toxinas, sin embargo, la suma de μg de equivalentes de OA/kg junto con los μg de equivalentes de PTX/kg fue superior a $160 \mu\text{g/kg}$ en 3 muestras con valores de $175,4$; $163,1$ y $234,1 \mu\text{g OA eq/kg}$ (muestras nº10, 17 y 22, respectivamente). Esto se debió sobre todo a los altos niveles de OA y DTX-2 en forma de ésteres presentes en estas muestras de mejillón. En muchos bivalvos, OA y DTX-2 se transforman en derivados del 7-O-acyl (DTX-3) por esterificación con ácidos grasos de diferente longitud de cadena de carbono. Es muy probable que esta sea la ruta principal para la eliminación de estos compuestos de los bivalvos (Blanco et al., 2018; Torgersen, Sandvik, Lundve, & Lindegarth, 2008). Por ejemplo, la muestra nº 22 tenía $30,2 \mu\text{g/kg}$ de OA libre, $183,4 \mu\text{g/kg}$ de OA esterificado, $10,9 \mu\text{g/kg}$ de DTX-2 libre y $22,6 \mu\text{g/kg}$ de DTX-2 esterificado, un total de $247,6 \mu\text{g/kg}$. Por lo tanto, los resultados obtenidos (Tabla 6) muestran que el OA, ya sea libre o esterificado, sigue siendo la principal toxina en los moluscos gallegos y demuestra que la cantidad esterificada es considerablemente mayor a la que se encuentra en forma libre de acuerdo con lo encontrado en la bibliografía, donde la cantidad de toxinas en la forma de ésteres es hasta 12 veces mayor (Rodríguez, L. P. et al., 2015; Villar-González, Rodríguez-Velasco, Ben-Gigirey, & Botana, 2007). Vale la pena mencionar que estas tres muestras que contenían altos niveles de toxinas del grupo OA provenían del mismo origen (Ría de Arousa) y se vendían bajo la misma marca comercial durante tres semanas seguidas (Rodríguez, L. P. et al., 2015; Villar-González, Rodríguez-Velasco, Ben-Gigirey, & Botana, 2007).

Cuando la PTX-2 está presente en moluscos, los niveles suelen ser bajos porque la PTX-2 sufre una biotransformación en los moluscos, dando lugar a la PTX-2 seco ácido (PTX-2sa), que suele estar en concentraciones más elevadas que la PTX-2, incluso diez veces superiores (Blanco et al., 2018). Por ello, la presencia de PTX-2 se asocia a bajos niveles en los moluscos (Dhanji-Rapkova et al., 2018; Rodríguez et al., 2015). Con respecto a los AZAs, el único análogo identificado y cuantificado fue el AZA-2, cuya aparición en los moluscos gallegos se publicó recientemente (Blanco et al., 2017). En este caso, AZA-2 también fue el análogo de AZA más abundante de los

tres AZAs monitorizados (AZA-1, AZA-2 y AZA-3) y el nivel máximo estimado fue de 3 µg/kg, valor comparable a 1,8 µg/kg de AZA -2 encontrado en el presente trabajo. Con respecto a las toxinas emergentes, cabe destacar que la presencia del SPX-13 es frecuente en la costa gallega desde el año 2006, cuando se detectaron en niveles de 13-20 µg/kg (Villar González et al., 2006). La presencia de SPX-13 y PnTX-G se ha encontrado recientemente en niveles bajos en moluscos comerciales del Mediterráneo (costa catalana de España, Italia y Eslovenia) (Rambla-Alegre et al., 2018). El SPX-13 se detectó en el 9,4% de las muestras analizadas en niveles de 26-66 µg/kg y PnTX-G en el 7,3% en cantidades más bajas (0,1-12 µg/kg). En el presente trabajo, SPX-13 se detectó en el 44% de las muestras hasta 28,9 µg/kg y la PnTX-G en un 12% en el rango 0,4 µg/kg-0,9 µg/kg).

Tabla 6. Cuantificación de las toxinas lipofílicas marinas encontradas en los mejillones comerciales, considerando la recuperación y la corrección de la matriz. El término ~ significa por debajo del límite de cuantificación. Los LOQ del análisis fueron los siguientes: LOQ (OA) = 0,3 µg/kg, LOQ (DTX-2) = 0,3 µg/kg, LOQ (PTX-2) = 0,3 µg/kg, LOQ (AZA-2) = 0,9 µg/kg, LOQ (SPX-13) = 0,4 µg/kg, LOQ (PnTX-G) = 0,4 µg/kg.

Muestras	OA libre (µg/kg)	OA total (µg/kg)	DTX-2 libre (µg/kg)	DTX-2 total (µg/kg)	µg OA eq/kg	PTX-2 (µg/kg)	µg PTX eq/kg	AZA-2 (µg/kg)	µg AZA eq/kg	SPX-13 (µg/kg)	PnTX-G (µg/kg)
1	0,4	23,9	~	~	23,9	~	~	~	~	~	~
2	~	6,6	~	~	6,6	1,7	1,7	~	~	~	~
3	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
4	~	127,2	~	21,7	140,2	~	~	~	~	~	~
5	8,8	83,0	0,4	6,4	86,8	1,8	1,8	1,8	3,2	12,7	~
6	6,5	105,0	~	3,3	107,0	~	~	~	~	~	~
7	~	52,8	~	~	52,8	~	~	~	~	~	~
8	~	36,9	~	5,5	40,2	~	~	~	~	~	~
9	13,1	128,6	3,3	17,4	139,0	2,3	2,3	1,1	2,0	16,2	0,9
10	~	167,5	~	13,2	175,4	~	~	~	~	~	~
11	4,4	54,0	~	~	54,0	1,8	1,8	~	~	5,4	0,6
12	1,8	30,1	~	~	30,1	1,0	1,0	~	~	4,4	0,4
13	6,0	86,3	~	~	86,3	1,2	1,2	~	~	11,6	~
14	7,3	83,2	~	~	83,2	2,4	2,4	~	~	4,4	~
15	4,3	27,2	0,3	2,7	8,8	1,7	1,7	~	~	4,0	0,4
16	8,5	129,6	6,3	18,2	140,5	1,3	1,3	~	~	7,4	~
17	~	158,9	~	7,0	163,1	0,7	0,7	0,9	1,6	13,4	~
18	12,2	56,0	0,5	0,9	56,5	1,4	1,4	0,9	1,6	28,9	~
19	1,7	18,9	~	0,7	19,3	0,8	0,8	~	~	2,6	~
20	2,3	19,1	0,8	5,5	22,4	1,4	1,4	~	~	3,5	~

21	13,9	113,0	3,6	16,1	122,6	2,9	2,9	~	~	13,3	~
22	30,2	214,0	11,0	33,5	234,1	~	~	~	~	~	~
23	7,1	55,6	1,1	5,2	58,7	1,9	1,9	0,9	1,6	14,7	~
24	7,5	75,3	3,1	21,9	88,4	~	~	~	~	~	~
25	~	3,6	~	~	3,6	~	~	~	~	0,6	~
26	~	2,3	~	~	28,3	~	~	~	~	~	~
27	2,3	48,1	4,7	23,5	62,2	~	~	1,5	2,7	9,9	~
28	~	19,7	~	~	19,7	~	~	~	~	11,9	~
29	~	9,8	~	~	9,8	~	~	~	~	~	~
30	~	7,7	~	~	7,7	~	~	~	~	~	~
31	~	10,7	~	~	10,7	~	~	~	~	~	0,5
32	~	17,0	~	9,6	22,76	~	~	~	~	~	~
33	~	22,0	~	~	22,0	~	~	~	~	16,3	~
34	0,9	27,3	~	1,7	28,3	~	~	~	~	~	~
35	~	23,2	~	~	23,2	~	~	~	~	10,8	~
36	~	37,8	~	1,6	38,8	~	~	~	~	~	~
37	~	7,8	~	1,9	8,9	~	~	~	~	~	~
38	~	27,0	~	~	27,0	~	~	~	~	~	~
39	~	27,1	~	~	27,1	~	~	~	~	~	~
40	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
41	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~

En resumen, la aparición de toxinas marinas lipofílicas preocupa a la región gallega tanto en materia de seguridad alimentaria como económica. En los últimos años, ha aumentado la presencia de toxinas emergentes en aguas europeas, lo que lleva a la posibilidad de que los consumidores se vean afectados por estos nuevos riesgos debido a moluscos contaminados en Galicia. En este trabajo, se ha aplicado el procedimiento europeo (EU-RL-MB, 2015) para la determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos por LC-MS/MS a mejillones de 5 marcas comerciales y procedentes de 3 Rías (Ares-Sada, Arousa y Pontevedra). Un total de 38 de las 41 muestras mostraron tener las toxinas lipofílicas OA, DTX-2, PTX-2, AZA-2, SPX-13 y PnTX-G. Las toxinas del grupo de OA se detectaron en el 93% de las muestras (7% excediendo el límite legal de 160 µg/kg) seguidas por el SPX-13 detectado en el 44% de las muestras hasta 28,9 µg/kg. PTX-2, AZA-2 y PnTX-G se encontraron en niveles más bajos. El 37% de las muestras mostró PTX-2 (0,7-2,9 µg/kg), 29% de AZA-2 (0,1-1,8 µg/kg) y 12% PnTX-G (0,4 µg/kg-0,9 µg/kg). En este trabajo se describe por primera vez la presencia de PnTX-G en mejillones gallegos. El OA y DTX-2, ya sean libres o esterificados, constituyen la principal

amenaza para los moluscos gallegos (los niveles más altos se encontraron en los mejillones de gran tamaño). A pesar de que no hay un riesgo potencial a través de la ingesta de mejillones para las toxinas emergentes (SPX-13 y PnTX-G), la presencia de nuevos análogos es una cuestión que debe considerarse en los programas de monitoreo mediante los métodos de LC-MS/MS. Aunque los datos sobre la aparición de PnTXs obtenidos en este estudio no permiten concluir que esta toxina representa actualmente un riesgo para la salud pública en Galicia, es necesario monitorizar las PnTXs para verificar riesgos futuros derivados del consumo de mejillones.

6. CONCLUSIONES

1. Las toxinas lipofílicas mayoritarias en mejillones comerciales gallegos son las toxinas del grupo del OA, ya que se encontraron en el 93% de las muestras (7% excediendo el límite legal de 160 µg/kg), seguidas por el SPX-13 detectado en el 44% de las muestras hasta una concentración de 28,9 µg/kg.
2. La PTX-2 y el AZA-2 están presentes en los mejillones gallegos en niveles más bajos ya que la PTX-2 se encontró en el 37% de las muestras en el rango de 0,7-2,9 µg/kg y el AZA-2 en el 29% de las muestras en el rango de 0,1-1,8 µg/kg.
3. La identificación de la PnTX-G en los mejillones confirma, por primera vez, la existencia de esta toxina emergente en moluscos de la costa atlántica gallega, aunque los niveles encontrados (0,4 µg/kg-0,9 µg/kg) en tan solo el 12% de las muestras, hace que no constituya un riesgo para la salud pública en Galicia.
4. Es necesario monitorizar las PnTXs en Galicia para verificar riesgos futuros derivados del consumo de mejillones. La técnica LC-MS/MS es un método eficaz para la detección de estas toxinas emergentes que deben ser consideradas en los programas de monitoreo mediante estos métodos de análisis.

Este trabajo se ha publicado con fecha 1 de Julio de 2019 en la revista *Toxins* (ISSN 2072-6651; factor de impacto 3.895) con el título:

“Confirmation of the Emerging Toxin Pinnatoxin-G and High levels of esterified OA group toxins in Galician Commercial Mussels by LC-MS/MS.”

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, A., de la Rosa, L., Vieytes, M. R., Yasumoto, T., & Botana, L. M. (2003). Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 65(2), 193-208. doi:10.1016/S0006-2952(02)01454-5
- Alfonso, A., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2016). Yessotoxin, a promising therapeutic tool. *Marine Drugs*, 14(2). doi:10.3390/md14020030
- Ares, I., Louzao, C., Espina, B., Vieytes, M., Miles, C., Yasumoto, T., & Botana, L. (2007). Lactone ring of pectenotoxins: A key factor for their activity on cytoskeletal dynamics. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 19(5-6), 283-292. doi:10.1159/000100647
- Baden, D. G., & Trainer, V. L. (1993). Mode of action of toxins of seafood poisoning. En I. R. Falconer (Ed.), *Toxins in seafood and drinking water*. (pp. 49-74). San Diego: Academic Press.
- Berdalet, E., Fleming, L. E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L. C., . . . Enevoldsen, H. (2015). Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: Challenges and opportunities in the 21st century. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 61-91. doi:10.1017/S0025315415001733
- Blanco, J., Arévalo, F., Moroño, Á, Correa, J., Muñiz, S., Mariño, C., & Martín, H. (2017). Presence of azaspiracids in bivalve molluscs from northern Spain. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 137, 135-143. doi:10.1016/j.toxicon.2017.07.025
- Boada, L. D., Zumbado, M., Luzardo, O. P., Almeida-González, M., Plakas, S. M., Granade, H. R., . . . Dickey, R. W. (2010). Ciguatera fish poisoning on the west Africa coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 56(8), 1516-1519. doi:10.1016/j.toxicon.2010.07.021
- Botana, A. M., Otero, P., Rodríguez, P., Alfonso, A., & Botana, L. M. (2012). Current situation on analysis of marine toxins. *Reviews in Analytical Chemistry*, 32(1), pp. 15-34. Recuperado de <https://doi.org/10.1515/revac-2012-0020>
- Botana, L. M., & Vilarinho, N. (2018). Una visión de las toxinas marinas en el horizonte del año 2050 desde la perspectiva del cambio climático, bioseguridad y la seguridad alimentaria. *Boletín del Instituto Español de Estudios Estratégicos (I.E.E.E)*, pp. 732-749. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6715649>

- Davidson, K., Gowen, R. J., Harrison, P. J., Fleming, L. E., Hoagland, P., & Moschonas, G. (2014). Journal of environmental management. *Journal of Environmental Management*, 146, 206-216. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.002>
- Dhanji-Rapkova, M., O'Neill, A., Maskrey, B. H., Coates, L., Teixeira Alves, M., Kelly, R. J., . . . Turner, A. D. (2018). Variability and profiles of lipophilic toxins in bivalves from great britain during five and a half years of monitoring: Okadaic acid, dinophys toxins and pectenotoxins. *Harmful Algae*, 77, 66-80. doi:10.1016/j.hal.2018.05.011
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2009. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish–Summary on regulated marine biotoxins. *EFSA Journal* 2009;7(8)1306, pp. 1-23. Recuperado de <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1306>
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2010. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish–Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriattoxins). *EFSA Journal* 2010; 8(6):1628. pp. 1-39. Recuperado de <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1628>
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2017. *Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods*. *EFSA Journal* 2017; 15(4):4752. Pp. 1-65. Recuperado de <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4752>
- Espiña, B., Louzao, M. C., Ares, I. R., Cagide, E., Vieytes, M. R., Vega, F. V., . . . Botana, L. M. (2008). Cytoskeletal toxicity of pectenotoxins in hepatic cells. *British Journal of Pharmacology*, 155(6), 934-944. doi:10.1038/bjp.2008.323
- EU-RL-MB, (2015). EU-harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. Recuperado de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/ARCHIVO2EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS_Version5.pdf
- Farabegoli, F., Blanco, L., Rodríguez, L. P., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2018). Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans. *Marine Drugs*, 16(6), 1-26. doi:10.3390/md16060188
- Ferreiro, S. F., Vilariño, N., Carrera, C., Louzao, M. C., Santamarina, G., Cantalapiedra, A. G., . . . Botana, L. M. (2017). *In vivo* cardiomyocyte response to YTX- and AZA-1-induced

- damage: Autophagy versus apoptosis. *Archives of Toxicology*, 91(4), 1859-1870. doi:10.1007/s00204-016-1862-0
- García-Altares, M., Casanova, A., Bane, V., Diogène, J., Furey, A., & de la Iglesia, P. (2014). Confirmation of pinnatoxins and spirolides in shellfish and passive samplers from catalonia (Spain) by liquid chromatography coupled with triple quadrupole and high-resolution hybrid tandem mass spectrometry. *Marine Drugs*, 12(6), 3706-3732. doi:10.3390/md12063706
- Gessner, B. D. (2000). Neurotic Toxins. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*. (pp. 65-85). Nueva York: Macel and Dekker.
- Gravinese, P. M., Saso, E., Lovko, V. J., Blum, P., Cole, C., & Pierce, R. H. (2019). *Karenia brevis* causes high mortality and impaired swimming behavior of florida stone crab larvae. *Harmful Algae*, 84, 188-194. doi:10.1016/j.hal.2019.04.007
- Grienke, U., Silke, J., & Tasdemir, D. (2014). Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chemistry*, 142, 48-60. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.027
- Guzmán-Pérez, S. E. y Park, D. L. (2002). Ciguatera Toxins: Chemistry and Detection. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection* (pp. 401-414). Nueva York: Macel and Dekker.
- Hattenrath-Lehmann, T. K., Lusty, M. W., Wallace, R. B., Haynes, B., Wang, Z., Broadwater, M., . . . Gobler, C. J. (2018). Evaluation of rapid, early warning approaches to track shellfish toxins associated with dinophysis and alexandrium blooms. *Marine Drugs*, 16(1) Recuperado de <https://doi.org/10.3390/md16010028>
- Hess, P. (2010). Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(5), 1683-1694. doi:10.1007/s00216-009-3444-y
- Hess, P., Abadie, E., Hervé, F., Berteaux, T., Séchet, V., Aráoz, R., . . . Amzil, Z. (2013). Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from ingril, a french mediterranean lagoon. *Toxicon*, 75, pp. 16-26. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.001>
- Hiolski, E. M., Ito, S., Beggs, J. M., Lefebvre, K. A., Litke, A. M., & Smith, D. R. (2016). Domoic acid disrupts the activity and connectivity of neuronal networks in organotypic brain slice cultures. *Neurotoxicology*, 56, 215-224. doi:10.1016/j.neuro.2016.08.004

- Hori, M., Yamaza, F., Matsuura, Y., Yoshimoto, R., Kaneda, T., Yasumoto, T., . . . Karaki, H. (2018). Inhibition of actin polymerization by marine toxin pectenotoxin-2. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(2), 225-234. doi:10.1292/jvms.17-0654
- Kodama, M. (2002). Ecobiology, Clasification, and Origin. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*. (pp. 125-144). Nueva York: Macel and Dekker.
- Krock, B., Tillmann, U., Tebben, J., Trefault, N., & Gu, H. (2019). Two novel azaspiracids from azadinium poporum, and a comprehensive compilation of azaspiracids produced by amphidomataceae, (dinophyceae). *Harmful Algae*, 82, 1-8. doi:10.1016/j.hal.2018.12.005
- Leonardo, S., Kiparissis, S., Rambla-Alegre, M., Almarza, S., Roque, A., Andree, K. B., . . . Campàs, M. (2019). Detection of tetrodotoxins in juvenile pufferfish lagocephalus scleratus (gmelin, 1789) from the north aegean sea (greece) by an electrochemical magnetic bead-based immunosensing tool. *Food Chemistry*, 290, 255-262. doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.148
- Lewis, R. J., Molgó, J. y J., A. D. (2002). Ciguatera Toxins: Pharmacology of Toxins Involved in Ciguatera and Related Fish Poisoning. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*. (pp. 419-440). Nueva York: Macel and Dekker.
- Lin, C., Liu, Z., Tan, C., Guo, Y., Li, L., Ren, H., . . . Lu, S. (2015). Contamination of commercially available seafood by key diarrhetic shellfish poisons along the coast of china. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(2), 1545-1553. doi:10.1007/s11356-014-3494-3
- Luisa Fernández, M., Reguera, B., González-Gil, S., & Míguez, A. (2006). Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of dinophysis caudata and dinophysis acuta from the galician rías (NW spain). *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 48(5), 477-490. doi:10.1016/j.toxicon.2006.05.016
- Masias, D., Gómez, K., Contreras, C., Gaete, L., & García, C. (2019). Rapid screening fluorescence method applied to detection and quantitation of paralytic shellfish toxins in invertebrate marine vectors. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(7), 118-1137. doi:10.1080/19440049.2019.1615645
- Mattarozzi, M., Cavazza, A., Calfapietra, A., Cangini, M., Pigozzi, S., Bianchi, F., & Careri, M. (2019). Analytical screening of marine algal toxins for seafood safety assessment in a

- protected mediterranean shallow water environment. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(4), 612-624. doi:10.1080/19440049.2019.1581380
- Molgó, J., Marchot, P., Aráoz, R., Benoit, E., Iorga, B. I., Zakarian, A., . . . Servent, D. (2017). Cyclic imine toxins from dinoflagellates: A growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 142(2), 41-51. doi:10.1111/jnc.13995
- Murata, M., Kumagai, M., Lee, J. S., & Yasumoto, T. (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters*, 28(47), 5869-5872. doi:10.1016/S0040-4039(01)81076-5
- Nielsen, L. T., Hansen, P. J., Krock, B., & Vismann, B. (2016). Accumulation, transformation and breakdown of DSP toxins from the toxic dinoflagellate *dinophysis acuta* in blue mussels, *mytilus edulis*. *Toxicon*, 117, 84-93. doi:10.1016/j.toxicon.2016.03.021
- O'Mahony, M. (2018). EU regulatory risk management of marine biotoxins in the marine bivalve mollusc food-chain. *Toxins*, 10(3). doi:10.3390/toxins10030118
- Otero, A., Chapela, M., Atanassova, M., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2011). Cyclic imines: Chemistry and mechanism of action: A review. *Chemical Research in Toxicology*, 24(11), 1817-1829. doi:10.1021/tx200182m
- Otero, P. & Alfonso, C. (2015). Analysis of marine toxins: gaps on food safety control of marine toxins. En L. M. Botana % A. Alfonso (Eds.), *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. (pp. 1-21). Nueva York: John Wiley & Sons, Ltd
- Otero, P., Alfonso, A., Alfonso, C., Vieytes, M. R., Louzao, M. C., Botana, A. M., & Botana, L. M. (2010b). New protocol to obtain spirolides from alexandrium ostenfeldii cultures with high recovery and purity. *Biomedical Chromatography*, 24(8), 878-886. doi:10.1002/bmc.1380
- Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N. N., . . . Botana, L. M. (2010a). First toxin profile of ciguateric fish in madeira arquipelago (Europe). *Analytical Chemistry*, 82(14), 6032-6039. doi:10.1021/ac100516q
- Paz, B., Daranas, A., Norte, M., Riobó, P., Franco, J., & Fernández, J. (2008). Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: An overview. *Marine Drugs*, 6(2), 73-102. doi:10.3390/md6020073

- Pelin, M., Kilcoyne, J., Florio, C., Hess, P., Tubaro, A., & Sosa, S. (2019). Azaspiracids increase mitochondrial dehydrogenases activity in hepatocytes: Involvement of potassium and chloride ions. *Marine Drugs*, 17(5). doi:10.3390/md17050276
- Pitcher, G. C., Foord, C. J., Macey, B. M., Mansfield, L., Mouton, A., Smith, M. E., . . . van der Molen, L. (2019). Devastating farmed abalone mortalities attributed to yessotoxin-producing dinoflagellates. *Harmful Algae*, 81, 30-41. doi:10.1016/j.hal.2018.11.006
- Radad, K., Moldzio, R., Al-Shraim, M., Al-Emam, A., & Rausch, W. (2018). Long-term neurotoxic effects of domoic acid on primary dopaminergic neurons. *Toxicology in Vitro*, 52, 279-285. doi:10.1016/j.tiv.2018.07.004
- Rambla-Alegre, M., Miles, C. O., de la Iglesia, P., Fernandez-Tejedor, M., Jacobs, S., Sioen, I., . . . Diogene, J. (2018). Occurrence of cyclic imines in european commercial seafood and consumers risk assessment. *Environmental Research*, 161, 392-398. doi:10.1016/j.envres.2017.11.028
- Reglamento (CE) No 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea. 2004, L139, 55.
- Reglamento (UE) 2017/1980 de la Comisión de 31 de octubre de 2017 por el que se modifica el anexo III del Reglamento (CE) No 2074/2005 con respecto al método de detección de las toxinas paralizantes de molusco (PSP). Diario Oficial de la Unión Europea. 2017, L285, 8-9.
- Reglamento (UE) No 15/2011 de la Comisión de 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. Diario Oficial de la Unión Europea. 2011, L6, 3-6.
- Reglamento (UE) No 786/2013 de la Comisión de 16 de agosto de 2013 por el que se modifica el anexo III del Reglamento (CE) no 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites autorizados de yessotoxinas en moluscos bivalvos vivos. Diario Oficial de la Unión Europea. 2013, L220, 14.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2019/627 de la Comisión, de 15 de marzo 2019, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se

- modifica el Reglamento (CE) n.º 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales. Diario Oficial de la Unión Europea. 2019, *L131*, 51-100.
- Rodríguez, I., Alfonso, A., Antelo, A., Alvarez, M., & Botana, L. M. (2016). Evaluation of the impact of mild steaming and heat treatment on the concentration of okadaic acid, dinophysistoxin-2 and dinophysistoxin-3 in mussels. *Toxins*, 8(6). doi:10.3390/toxins8060175
- Rodríguez, L. P., González, V., Martínez, A., Paz, B., Lago, J., Cordeiro, V., . . . Cabado, A. G. (2015). Occurrence of lipophilic marine toxins in shellfish from galicia (NW of Spain) and synergies among them. *Marine Drugs*, 13(4), 1666-1687. doi:10.3390/md13041666
- Rodriguez, P., Alfonso, A., Vale, C., Alfonso, C., Vale, P., Tellez, A., & Botana, L. M. (2008). First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *chironia lampas lampas* in Europe. *Analytical Chemistry*, 80(14), 5622-5629. doi:10.1021/ac800769e
- Rundberget, T., Aasen, J. A. B., Selwood, A. I., & Miles, C. O. (2011). Pinnatoxins and spirolides in norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon*, 58(8), 700-711. doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.008
- Stivala, C. E., Benoit, E., Aráoz, R., Servent, D., Novikov, A., Molgó, J., & Zakarian, A. (2015). Synthesis and biology of cyclic imine toxins, an emerging class of potent, globally distributed marine toxins. *Natural Product Reports*, 32(3), 411-435. doi:10.1039/c4np00089g
- Suzuki, T., & Quilliam, M. A. (2011). LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 27(6), pp. 571-584. Recuperado de <https://doi.org/10.2116/analsci.27.571>
- Terao, K. (2002). Ciguatera Toxins: Toxicology. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection* (pp. 449-470). Nueva York: Macel and Dekker.
- Tong, T. T. V., Le, T. H. H., Tu, B. M., & Le, D. C. (2018). Spatial and seasonal variation of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in bivalve mollusks from some coastal regions of vietnam and assessment of potential health risks. *Marine Pollution Bulletin*, 133, pp. 911-919. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.045>

- Tosteson, M. T. (2000). Palytoxin. Mechanism of action, pharmacology and toxicology. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*. (pp. 549-566). Nueva York: Macel and Dekker.
- Tubaro, A., Dell'Ovo, V., Sosa, S., & Florio, C. (2010). Yessotoxins: A toxicological overview. *Toxicon*, 56(2), pp. 163-172. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.038>
- Turner, A. D., Turner, L. M., Dhanji-Rapkova, M., Rowland-Pilgrim, S., Rai, A., Venugopal, M. N., . . . Godhe, A. (2017). Assessing the presence of marine toxins in bivalve molluscs from southwest india. *Toxicon*, 140, 147-156. doi:10.1016/j.toxicon.2017.11.001
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Pásaro, E., Méndez, J., & Laffon, B. (2013). Okadaic acid: More than a diarrheic toxin. *Marine Drugs*, 11(11), pp. 4328-4349. Recuperado de <https://doi.org/10.3390/md11114328>
- Van Dolah, F. M. (2000). Diversity of marine and freshwater algal toxins. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood and freshwater toxins. pharmacology, physiology and detection* (pp. 19-37). Nueva York: Marcel and Dekker.
- Vilariño, N., Louzao, M. C., Abal, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2018). Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins*, 10(8) doi:10.3390/toxins10080324
- Villar, A., Rodríguez-Velasco, M. L., Ben-Gigirey, B., & Botana, L. M. (2006). First evidence of spirolides in spanish shellfish. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 48(8), 1068-1074. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.001
- Villar-González, A., Rodríguez-Velasco, M. L., Ben-Gigirey, B., & Botana, L. M. (2007). Lipophilic toxin profile in galicia (spain): 2005 toxic episode. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(8), 1129-1134. doi:10.1016/j.toxicon.2007.02.002
- Visciano, P., Schirone, M., Berti, M., Milandri, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Marine biotoxins: Occurrence, toxicity, regulatory limits and reference methods. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01051
- Vlami, A., Katikou, P., Rodriguez, I., Rey, V., Alfonso, A., Papazachariou, A., . . . Botana, L. M. (2015). First detection of tetrodotoxin in greek shellfish by UPLC-MS/MS potentially linked to the presence of the dinoflagellate *prorocentrum minimum*. *Toxins*, 7(5), 1779-1807. doi:10.3390/toxins7051779

- Wright, J. L. C. & Cembella, A. D., (1998). Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxins. En D. M. Anderson, A. D. Cembella & G. M. Hallegraeff (Eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms* (pp. 427-452). Heidelberg (Berlín): Springer-Verlag.
- Yasumoto T. (2000). Historic considerations regarding seafood safety. En L. M. Botana (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. (pp. 1-18). Nueva York: Marcel and Dekker.